



TIETO- JA SÄHKÖTEKNIIKAN TIEDEKUNTA  
ELEKTRONIIKAN JA TIETOLIIKENNETEKNIIKAN TUTKINTO-OHJELMA

## **DIPLOMITYÖ**

# **SPAD-RIVISENSORIN AJOITUSEPÄIDEAALISUUKSIEN KOMPENSOINTIMENETELMIÄ AIKAPORTITETTUUN RAMANSPEKTROSKOPIAAN**

Tekijä

Tuomo Talala

Valvoja

Ilkka Nissinen

Toinen tarkastaja

Jan Nissinen

Marraskuu 2018

**Talala T. (2018) SPAD-rivisensorin ajoitusepäideaalisuuksien kompensointimenetelmiä aikaportitettuun ramanspektroskopiaan.** Oulun yliopisto, tieto- ja sähkötekniikan tiedekunta, elektroniikan ja tietoliikennetekniikan tutkinto-ohjelma. Diplomityö, 67 s.

## **TIIVISTELMÄ**

Työssä selvitettiin aikaportitetussa ramanspektroskopiassa käytettävän CMOS SPAD -rivisensorin ajoitusvirheiden vaikutusta mitattuun ramanspektriin ja kehitettiin menetelmiä ajoitusvirheiden määrittämiseen sekä spektriin ajoitusvirheistä aiheutuvien vääristymien korjaamiseen. Lisäksi selvitettiin ajoitusvirheiden korjaamisen kannalta aikaerotteiselle sensorille sopiva aikaresoluutio.

Ramanspektroskopian suurimpia ongelmia on näytteiden voimakas fluoresenssi, jonka seasta ramansirontaa on vaikea havaita. Mittauksen aikaportitus on tehokas keino fluoresenssin vähentämiseksi. Mittauksen signaali-kohinasuhteen kannalta optimaalisesti asetetun aikaportin loppuhetkellä fluoresenssitaso on lähellä huippuaan. Tästä johtuen voimakkaasti fluoresoivan näytteen tapauksessa pieni poikkeama aikaportin loppuhetkessä vaikuttaa merkittävästi havaittujen fotonien määrään ja kun spektri mitataan monikanavaisella sensorilla, aikaportin loppuhetken vaihtelu kanavien välillä vääristää spektriä. Vääristymän suuruuteen vaikuttaa aikaportin loppuhetken ajallisen vaihtelun lisäksi näytteen fluoresenssitaso ja fluoresenssin aikavakio.

Ajoitusvirheiden määrittämiseen kehitettyjä menetelmiä voidaan käyttää ramanspektrometrin ollessa normaalissa toimintatilassaan ilman erityistä karakterisointilaitteistoa. Nopean menetelmän käyttöön tarvitaan vain kalibrointinäyte, jonka fluoresenssin aikavakio on lyhyt suhteessa käytetyn laserin pulssin leveyteen. Tarkempaan ja hitaampaan menetelmään tarvitaan lisäksi tarkasti säädettävä optinen tai sähköinen viive-elementti. Ajoitusvirheistä aiheutuvaa spektrin vääristymistä voidaan kompensoida mittaustulosten jälkikäsitelyssä kompensointimenetelmien tehokkuuden riippuessa olennaisesti ajoitusvirheiden määrittämisen tarkkuudesta. Tehtyjen mittausten perusteella spektrien luettavuutta voidaan parantaa kompensointimenetelmillä merkittävästi ja kompensoinnin avulla spektreistä voidaan löytää yksityiskohtia, joiden havaitseminen olisi ilman kompensointia mahdotonta. Tarkemmalla menetelmällä spektrin vääristymiä saatiin vähennettyä koko spektrin alueella yli 70% ja nopeammallakin menetelmällä yli 50%. Kehitettyjen menetelmien kannalta aikaportitettuun ramanspektroskopiaan käytettävän sensorin aikaresoluutioksi sopii nykyisten laserien ja SPAD-ilmaisinten arvoilla noin 50 ps.

**Avainsanat:** aikaportitettu ramanspektroskopia, ajoitusvirhe, aikaerotteinen SPAD.

## **ABSTRACT**

**Distortion in Raman spectrum, caused by a timing skew of a time-resolved CMOS SPAD line sensor, was studied. Then methods for resolving the timing skew and to compensate for its effects on the Raman spectrum were developed. Suitable temporal resolution for a time-resolved sensor to be used in time-gated Raman spectroscopy was also considered.**

**The measured Raman spectrum is masked by a strong fluorescence background in many applications. Efficient fluorescence suppression can be achieved with time gating. With a highly fluorescent sample and a time gate set to an optimal time position, fluorescence level is very high at the point where time gate closes. Because of high fluorescence level even a small variation in the time gate end point makes the number of detected photons vary significantly. Variation along the spectral points of a sensor creates distortion to the Raman spectrum. The magnitude of distortion caused by the timing skew depends on the fluorescence level and lifetime of a sample and on the size of the timing skew.**

**Methods developed for resolving the timing skew can be used when Raman spectrometer is in a normal operating mode. Only a calibration sample with a short fluorescence lifetime and an adjustable delay line (optical or electrical) is needed. Distortion in the Raman spectrum caused by the timing skew can be reduced noticeably with post processing, the efficiency of which depends on the precision of a timing skew measurement. Two post processing methods were used and according to measurement results, the quality of measured Raman spectrum can be improved significantly with the post processing methods presented. With a more precise method distortion could be decreased by more than 70% and with a quick method by more than 50%. Considering the developed methods and the lasers and SPAD detectors available at the time, suitable temporal resolution for a sensor to be used in time-gated Raman spectroscopy is about 50 ps.**

**Keywords: time-gated Raman spectroscopy, timing skew, time-resolving SPAD.**

# SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ.....	2
ABSTRACT .....	3
SISÄLLYSLUETTELO .....	4
ALKULAUSE .....	5
LYHENTEIDEN JA MERKKIEN SELITYKSET.....	6
1 JOHDANTO .....	8
2 RAMANSPEKTROSKOPIA .....	9
2.1 Ramansironta.....	9
2.2 Ramanspektroskopian perusteet .....	10
2.3 Menetelmiä fluoresenssin vaikutuksen vähentämiseksi.....	11
2.4 Aikaportitettu ramanspektroskopia .....	12
3 AIKAPORTITETUT SPAD-ILMAISIMET RAMANSPEKTROSKOPIASSA.....	15
3.1 SPAD-ilmaisim.....	15
3.2 SPAD-ilmaisimeen perustuva ramanspektrometri .....	17
4 AIKAEROTTEISEN SENSORIN AJOITUSVIRHEET .....	19
4.1 Ajoitusvirheiden syyt .....	19
4.2 Ajoitusvirheiden vaikutus ramanspektriin.....	20
5 AJOITUSVIRHEIDEN MÄÄRITYS JA KOMPENSOINTI .....	25
5.1 Ajoitusvirheiden määrittäminen .....	25
5.2 Ajoitusvirheiden kompensointi .....	28
6 SIMULOINNIT .....	29
6.1 Menetelmä M1 .....	29
6.2 Menetelmä M2 .....	30
6.3 Menetelmät K1 ja K2 .....	31
6.4 Menetelmät M3 ja K3.....	33
6.5 Laserpulssin leveys ja SPAD-ilmaisimen jitteri.....	35
7 MITTAUKSET .....	36
7.1 Menetelmä M1 .....	36
7.2 Menetelmä K1 .....	39
7.3 Menetelmät M3 ja K3.....	43
7.4 Laskukaava ajoitusvirheen vaikutusten arviointiin .....	45
8 POHDINTA .....	47
8.1 Kehitetyt menetelmät .....	47
8.2 Uuden sensorin vaatimusmäärittely .....	48
9 YHTEENVETO .....	50
10 LÄHTEET .....	51
11 LIITTEET .....	54

## ALKULAUSE

Tämä työ on tehty Oulun yliopiston Elektroniikan piirit ja järjestelmät –tutkimusyksikössä syksyn 2018 aikana. Työ on tehty osana Suomen akatemian RADDESS-hankeohjelmaan kuuluvaa hanketta ”Yksittäisiä fotoneja havaitsevan detektorin kehittäminen yhdenaikaiseen merkkivapaaseen Raman- ja fluoresenssielinaikaspektrokopiaan”.

Kiitän työn ohjaajana toiminutta Ilkka Nissistä mahdollisuudesta suorittaa diplomityö mielenkiintoisen hankkeen puitteissa sekä kannustavasta ohjauksesta. Esitän kiitokset myös Jan Nissiselle työn toisena tarkastajana toimimisesta ja Vassil Palankovskille hyödyllisistä huomioista työn ulkoasun parantamiseksi.

Oulussa 9.11.2018

Tuomo Talala

## LYHENTEIDEN JA MERKKIEN SELITYKSET

CCD	charge-coupled device, eräs valosensorityyppi
DCR	dark count rate, pimeäliipaisutahti
FWHM	full width half maximum, puoliarvon leveys
ICCD	intensified charge-coupled device, eräs valosensorityyppi
CMOS	complementary metal oxide semiconductor, eräs puolijohdeteknologia
K1	ajoitusvirheen kompensointimenetelmä
K2	ajoitusvirheen kompensointimenetelmä
K3	ajoitusvirheen kompensointimenetelmä
M1	ajoitusdatan määrittäminen
M2	ajoitusdatan määrittäminen
M3	ajoitusdatan määrittäminen
NMOS	n-channel MOS, eräs transistorityyppi
PDE	photon detection efficiency, fotonien ilmaisun hyötysuhde
PMOS	p-channel MOS, eräs transistorityyppi
SERDS	shifted-excitation raman difference spectroscopy, eräs ramanspektroskopian menetelmä
SNR	signal-to-noise ratio, signaali-kohinasuhde
SPAD	single photon avalanche diode, yksittäisiä fotoneja ilmaiseva vyöryvalodiode
TDC	time-to-digital converter, aika-digitaalimuunnin
$A$	fotonien aikajakauman pinta-ala
$c$	valon nopeus tyhjiössä, noin $3 \cdot 10^8$ m/s
$C_r$	ramansironnan intensiteettiä kuvaava vakio
$C_f$	fluoresenssin intensiteettiä kuvaava vakio
$C_{t/n}$	menetelmässä M1 käytettävä muuntokerroin
$E$	energia
$G$	laserpulssin muotoa kuvaava funktio
$H$	fotonien aikajakauman huippuarvo
$h$	Planckin vakio, noin $6,63 \cdot 10^{-34}$ Js
$n$	mitattu fotonimäärä
$N_R$	ramansironneiden fotonien lukumäärä
$N_E$	ajoitusvirheen aiheuttama fotonimäärä
$R_{A/H}$	fotonien aikajakauman pinta-alan ja huipun korkeuden suhde
$R_{F/R}$	raman- ja fluoresenssifotonien määrien suhde
$R_l$	SPAD-ilmaisimen sammutuspiirin vastus
$R_{R/E}$	ramanpiikin ja ajoitusvirheestä johtuvan spektriin korkeuksien suhde
$R_q$	SPAD-ilmaisimen sammutuspiirin vastus
$S$	ajoitusvirhe (ps)
$t$	aika
$t_1$	menetelmään M1 liittyvä aikaväli

$t_2$	menetelmään M1 liittyvä aikaväli
$t_v$	menetelmään M1 liittyvä aikaväli
$V_b$	SPAD-ilmaisimen läpilyöntijännitteen ylittävä biasjännite
$V_{load}$	SPAD-ilmaisimen sammutuspiirin ohjaussignaali
$V_{quench}$	SPAD-ilmaisimen sammutuspiirin ohjaussignaali
$V_{supply}$	käyttöjännite
$\lambda$	aallonpituus
$\tau_F$	fluoresenssin aikavakio
$\nu$	aaltoluku
$\nu_{ra}$	ramansiirtymä
$\sigma_E$	aikaportin loppuhetken keskihajonta
$\sigma_m$	ajoitusdatan määrittämisessä syntyvän virheen keskihajonta
$\sigma_w$	aika-arvojen pituuksien keskihajonta

# 1 JOHDANTO

Ramanspektroskopia on vuosikymmeniä käytössä ollut valon ramansirontaan perustuva kemiallinen analyysimenetelmä, jolla voidaan tutkia näytteiden koostumuksia ja pitoisuuksia. Ramanspektroskopiolla on käyttöä muun muassa lääketieteessä, farmasian, arkeologian ja rikostekniikan aloilla [1-4]. Perinteisen jatkuva-aikaisen ramanspektroskopian suurin haaste on ollut tutkittavien näytteiden fluoresenssi, jonka seasta ramansirontaa on vaikea havaita. Fluoresenssia on pyritty vähentämään lukuisin eri keinoin näistä lupaavimpana mittauksen aikaportitus. Aikaportitus perustuu siihen, että lyhyitä, noin sadan pikosekunnin laserpulsseja käyttäen ramansirontaakin esiintyy yhtä lyhyiden ajanjaksojen aikana. Fluoresenssia taas havaitaan selvästi pidempään fluoresenssin aikavakioiden ollessa näytteestä riippuen nanosekunteja tai mikrosekunteja. Rajoittamalla mittaus vain laserpulssien ajalle saadaan suuri osa fluoresenssista rajattua mittauksen ulkopuolelle. Aikaportitusta on laboratorioissa toteutettu erilaisia monimutkaisia ja kalliita laitteistoja käyttäen.

2010-luvun alusta alkaen Oulun yliopiston Elektroniikan piirit ja järjestelmät –yksikössä ja tämän jälkeen myös muiden yliopistojen tutkimusryhmissä on kehitetty aikaportitettua ramanspektroskopiaa yksittäisiä fotoneja ilmaiseviin CMOS SPAD –ilmaisimiin (Complementary Metal Oxide Semiconductor, Single Photon Avalanche Diode) ja ilmaisimien kanssa samoille integroiduille piireille valmistettuihin aikavälinmittauspiireihin perustuen. CMOS SPAD –ilmaisimia käyttäen yhdelle integroidulle piirille on valmistettu 128-1024 aikaportitettua kanavaa [5, 6]. Tämä mahdollistaa aikaportitetun ramanmittauksen tekemisen merkittävästi aiempaa pienikokoisemmalla ja yksinkertaisemmalla laitteistolla. Integroitujen piirien mittaluokassa edellä mainitut SPAD-matriisit ovat kuitenkin suuria, pituudeltaan millimetreistä kymmeniin millimetreihin. Suurikokoisessa ilmaisimimatriisissa eri osa-alueiden välillä on epäsovitusta ja aikaportitusta ohjaavien ajoitussignaalien vienti matriisiin eri osiin tarkalleen samalla ajanhetkellä ei onnistu. Kanavien välisten ajoituspoikkeamien seurauksena ramanspektrin eri osissa mittauksen ajankohta ja kesto ovat hieman erilaisia. Poikkeamista johtuva spektrin vääristyminen on merkittävää käytettäessä lyhyitä laserpulsseja ja erityisesti mitattaessa entistä korkeamman fluoresenssitason näytteitä.

Tämän työn tarkoituksena on kehittää menetelmiä monikanavaisen aikaerotteisen CMOS SPAD –sensoripiirin kanavien välisten ajoitusvirheiden määrittämiseen ja edelleen ajoitusvirheiden aiheuttamien mittaustulosten vääristymien vähentämiseen. Tavoitteena on, että kehitettäviä menetelmiä voidaan käyttää suoraan ramanspektroskopiaan tarkoitetulla laitteistolla eikä erillistä karakterisointilaitteistoa tarvita. Menetelmiä tarkastelemalla pyritään tuottamaan vaatimusmäärittely seuraavan sukupolven sensoripiirille siten, että ajoitusvirheiden aiheuttamat mittaustulosten vääristymät vähenisivät vertailukohtana käytettävään Elektroniikan piirit ja järjestelmät –yksikössä aiemmin suunniteltuun sensoripiiriin verrattuna.

Työn rakenne on seuraavanlainen. Toisessa luvussa esitetään perusteet ramanspektroskopiasta sekä aikaportituksesta ja kolmannessa luvussa pääkohdat aikaportitetun ramanspektroskopian toteutuksesta CMOS SPAD –ilmaisimilla. Neljännessä luvussa tarkastellaan aikaerotteisen sensorin ajoitusvirheiden vaikutusta mitattuun ramanspektriin. Viidennessä luvussa kuvataan menetelmiä ajoitusvirheiden määrittämiseen sekä kompensointiin. Menetelmien testaukseen tehdyt simuloinnit on esitetty luvussa kuusi ja mittaukset luvussa seitsemän. Tulosten pohdinta on esitetty luvussa kahdeksan ja yhteenveto työstä luvussa yhdeksän.



## 2 RAMANSPEKTROSKOPIA

### 2.1 Ramansironta

Valon osuessa väliaineen atomeihin tai molekyyliin tapahtuu sirontaa. Elastisessa sironnassa fotonin suunta voi muuttua, mutta aallonpituus säilyy ennallaan. Molekyylien kokoluokassa olevista kohteista tapahtuvaa elastista sirontaa kutsutaan Rayleigh-sironnaksi. Vuonna 1928 intialainen fyysikko C.V. Raman havaitsi uudenlaista sirontaa, jossa suunnan lisäksi sironneen fotonin aallonpituus poikkeaa alkuperäisestä aallonpituudesta [7]. Tätä epäelastista sirontaa kutsutaan nykyään ramansironnaksi. Rayleigh-sirontaan verrattuna ramansironta on hyvin epätodennäköinen ilmiö: Rayleigh-sirontan todennäköisyys on suuruusluokaltaan noin miljoonakertainen ramansirontaan verrattuna. Ramansirontan todennäköisyys on myös voimakkaasti molekyyliin osuvan valon aallonpituuden funktio sirontan vähentyessä suuremmilla aallonpituuksilla. [8, s. 16-17]

Ramansironnassa molekyylin ja fotonin törmäyksen yhteydessä molekyylin vibraatio- tai rotaatiotila muuttuu. Samalla fotonin energia muuttuu tilanmuutoksessa sitoutuvan tai vapautuvan energiamäärän verran niin, että kokonaisenergia säilyy. Fotonin energian muutoksen suuntaan viitataan ramanspektroskopiassa termeillä Stokes (fotonin energia pienenee) ja anti-Stokes (fotonin energia kasvaa). Huoneenlämmössä Stokes-sironta on huomattavasti anti-Stokes-sirontaa todennäköisempää mutta ero pienenee lämpötilan kasvaessa. [8, s. 16-17]

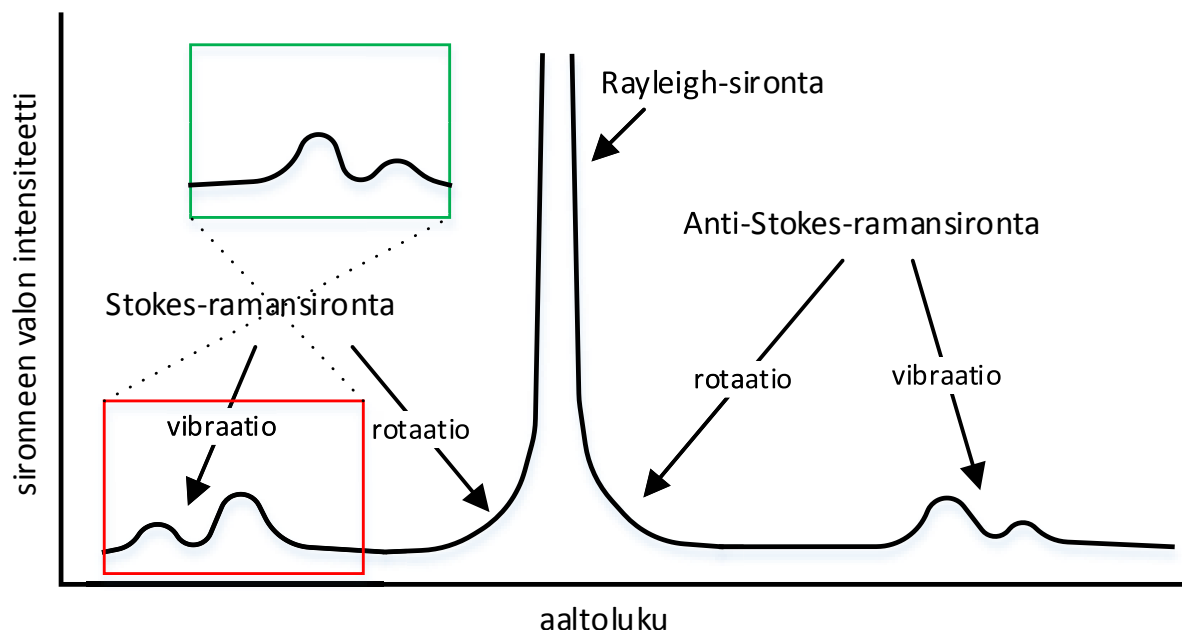
Aaltoluvulla tarkoitetaan valon (tai muun aaltoliikkeen) aallonpituuden käänteislukua, jolle spektroskopiassa tyypillisesti käytetään yksikköä  $\text{cm}^{-1}$ . Laskemalla ramansironnassa syntyneen fotonin ja alkuperäisen fotonin aaltolukujen erotus saadaan tuloksena ramansiirtymä. Stokes-suuntaan positiivinen ramansiirtymä  $\nu_{\text{ra}}$  yksikössä  $\text{cm}^{-1}$  on

$$\nu_{\text{ra}} = \left( \frac{1}{\lambda_1} - \frac{1}{\lambda_2} \right) \cdot 10^7, \quad (1)$$

missä  $\lambda_1$  (nm) on fotonin alkuperäinen aallonpituus ja  $\lambda_2$  (nm) on sironneen fotonin aallonpituus. Ramanspektri muodostuu ramansironneen valon intensiteetistä ramansiirtymän funktiona. Monokromaattisen valon sironnasta muodostuvan spektrin muodostuminen on esitetty kuvassa 1 [mukaillen 9, s. 319]. Jatkossa tässä työssä esitettävät ramanspektrit vastaavat kuvan 1 vihreällä merkittyä aluetta. Fotonin energia on

$$E = hc \cdot \frac{1}{\lambda}, \quad (2)$$

missä  $h$  on Planckin vakio,  $c$  on valon nopeus tyhjiössä ja  $\lambda$  on fotonin aallonpituus. Siis fotonin energia on suoraan verrannollinen aaltolukuunsa. Näin ollen tietyn suuruinen muutos fotonin energiassa aiheuttaa aaltolukuun aina yhtä suuren muutoksen fotonin alkuperäisestä energiasta riippumatta. Tämän seurauksena tietyille molekyyliin ominaisten ramansiirtymien suurus on sama riippumatta sirontaa aiheuttavan valon aallonpituudesta.



Kuva 1. Monokromaattisen valon sironnasta muodostuva spektri.

## 2.2 Ramanspektroskopian perusteet

Kaikista ramanspektrometreistä löytyviä peruskomponentteja ovat monokromaattinen valonlähde, sironneen valon keräysoptiikka, dispersiota aiheuttava optinen elementti kuten hila sekä valosensori. Valonlähteenä on perinteisesti jatkuva-aikainen suuritehoinen laser, jonka aallonpituus voi olla ultraviolett-, näkyvän valon tai infrapuna-alueella. Sekä laserin suuri tehotaso että erityinen sironneen valon keräysoptiikka tarvitaan ramansironnan pienestä todennäköisyydestä johtuen. Hilan tehtävänä on hajottaa sironneen valon eri aallonpituudet erilleen toisistaan, jotta paikkaherkällä sensorilla voidaan havaita määrättyjä aallonpituuksia. Ramanspektrometreissä sensoreina on käytetty valomonistinputkia, CCD- tai ICCD-kennoja (Intesified Charge Coupled Device) ja uusimmissa laitteistoissa integroidulle piirille valmistettuja CMOS SPAD -sensoreita. Sensori voi olla joko yksi- tai monikanavainen. Yksikanavaisen sensorin tapauksessa sensoria täytyy liikuttaa ja mittausdataa kerätä vaihteittain koko aaltolukualueen kattamiseksi, kun taas monikanavaisella sensorilla koko spektrin voi tallentaa satojen tai tuhansien spektripisteiden tarkkuudella kerralla [10, 6]. Edellä mainittujen komponenttien lisäksi ramanspektroskopiassa käytettävä laitteisto voi sisältää paljon muitakin osia kuten optisia kuituja ja suodattimia sekä mittaustulosten tallennukseen käytettävän tietokoneen. [11]

Ramanspektroskopiaa verrataan usein infrapunaspektroskopiaan, joka myöskin perustuu molekyylien värähtelytiloihin. Tässä vertailussa ramanspektroskopian etuna on monessa tapauksessa helpompi näytteiden käsittely, joka johtuu infrapuna-aallonpituuksien voimakkaasta absorptiosta vedessä ja lasissa. Näkyvän valon alueella toimivassa ramanspektroskopiassa voidaan käyttää tavallisia lasiastioita ja analysoida vesiliuoksia ilman absorption aiheuttamia ongelmia. Ramanspektroskopian käyttöä vesiliuosten analysointiin helpottaa vesimolekyyleistä tulevan ramansironnan vähäinen määrä [10]. Lisäksi ramanspektroskopian etuna on sen soveltuvuus hyvin pienille määrille näytettä. [11, 12, 13 s. 105]

Ramanspektroskopiassa on myös omat ongelmansa. Esimerkiksi suuritehoisia lasereita käytettäessä analysoitavan näytteen lämpötila voi nousta niin paljon, että näytteessä alkaa tapahtua muutoksia. Selkeästi suurin ramanspektroskopian käyttöä rajoittava ongelma on fluoresenssi. Fluoresenssi-ilmiössä fluoresoiva aine absorboi fotoneja ja fotonien energialla elektroneja virittyy korkeammille viritystiloille. Elektronien siirtyessä takaisin alemmille viritystiloille aine emittoi fotoneja, joiden aallonpituus on lähes aina absorboituneiden fotonien aallonpituutta suurempi. Fluoresenssi tuottaa siis fotoneja samoille aallonpituuksille kuin Stokes-ramansironta ja koska se on ilmiönä hyvin paljon ramansirontaa voimakkaampi, voi näytteestä riippuen ramanspektrin havaitseminen fluoresenssin seasta olla hankalaa tai mahdotonta. [12, 14]

### 2.3 Menetelmiä fluoresenssin vaikutuksen vähentämiseksi

Fluoresenssin hättäväikutuksia on pyritty poistamaan ramanspektroskopian mittauksissa monilla eri menetelmillä. Menetelmästä riippuen pyritään joko vähentämään fluoresenssia, lisäämään ramansirontaa tai vain erottelemaan fluoresenssin ja ramansironnan osuudet mittaustuloksista mahdollisimman tehokkaasti. Apua voi olla muun muassa näytteen tarkasta puhdistamisesta, näytteen altistamista pitkäaikaisesti tehokkaalle laserille, käytettävän laserin aallonpituuden muuttamisesta tai anti-Stokes-sironnan tarkastelusta Stokes-sironnan sijaan. Pidemmälle kehitetyistä menetelmistä tässä luvussa esitellään lyhyesti resonanssiramanspektroskopia, taajuustason demodulaatio ja SERDS-menetelmä (Shifted-Excitation Raman Difference Spectroscopy).

Pitkäaikainen valaisu tehokkaalla laserilla voi alentaa fluoresenssitasoa ajan mittaan, mutta menetelmä ei toimi kaikille näytteille ja vie paljon aikaa. Esimerkiksi luunäytteiden tapauksessa fluoresenssitason puolittaminen tällä tavalla on vaatinut 15-100 minuutin valaisun [15]. Lisäksi menetelmä voi aiheuttaa näytteeseen fysikaalisia ja kemiallisia muutoksia. [16]

Fluoresenssia voidaan tehokkaasti vähentää käyttämällä lähi-infrapuna-alueella toimivaa laseria näkyvän valon alueella toimivan sijaan. Laserin aallonpituuden kasvattamisen huonona puolena on myös ramansironnan voimakas väheneminen ramansironnan ollessa kääntäen verrannollinen laserin aallonpituuden neljänteen potenssiin [8, s. 17]. Heikommasta ramansironnasta seuraa mittausajan kasvu, mutta monissa näytteissä fluoresenssitaso laskee infrapuna-alueelle siirryttäessä niin paljon, että infrapunalaserin käyttö on silti kannattavaa. [17]

Normaalisti fluoresenssissa emittoituvan fotonin energia on pienempi kuin absorboituneen fotonin energia, joten fluoresenssia on vähemmän anti-Stokes-ramansironnan aallonpituuksilla kuin Stokes-sironnan aallonpituuksilla. Fluoresenssin vaikutus on siis vähäisempi, jos ramanspektristä otetaan tarkasteluun anti-Stokes-puoli. Haastetta anti-Stokes-spektrin tarkasteluun syntyy kuitenkin siitä, että anti-Stokes-sirontaa tapahtuu Stokes-sirontaan verrattuna tyypillisesti alle kymmenesosan verran. [17]

Mikäli käytettävän laserin aallonpituus voidaan valita niin, että fotonien energia on hyvin lähellä energiaa, joka tarvitaan molekyylin elektronien nostamiseen ylemmälle viritystilalle, ramansironnan todennäköisyys kasvaa monta kertaluokkaa suuremmaksi. Tarkasti valitulla aallonpituudella saadaan siis aikaan resonanssi, jolla tietty ramanspektrin piikki voi kasvaa jopa miljoonakertaiseksi muilla laserin aallonpituuksilla muodostettuihin spektreihin verrattuna. Menetelmän käyttö vaatii kuitenkin aina laserin, jonka aallonpituus on säädettävissä tarkasti eikä senkään avulla anna tietoa kaikista molekyyllirakenteista. [18]

Taajuustason demodulaatiossa laserin intensiteettiä moduloidaan korkealla, satojen megahertsien taajuudella. Nopeasti tapahtuvan ramansironnan intensiteetti mukailee laserin intensiteettiä, mutta fluoresenssi muodostaa hitaudestaan johtuen alipäästösuodatuksen

korkeataajuiselle modulaatiolle. Laserin modulaatio näkyy siis vähemmän fluoresenssitasossa kuin ramansignaalin tasossa ja lisäksi näiden välille syntyy alipäästösuodatuksesta vaihe-eroa, jonka perusteella signaalit voidaan jälkikäsittelyssä erottaa toisistaan paremmin kuin ilman modulaatiota. Menetelmän on raportoitu toimivan ainakin silloin, kun modulaation jaksonaika on fluoresenssin aikavakion kanssa samaa suuruusluokkaa. Hyvin lyhyillä fluoresenssin elinajoilla menetelmä edellyttää siis laserin intensiteetin modulointia erittäin korkeilla taajuuksilla. [19]

SERDS-menetelmän tausta-ajatuksena on se, että pieni muutos laserin aallonpituudessa ei vaikuta fluoresenssiin mutta aiheuttaa pienen siirtymän ramansironnasta syntyvien fotonien aallonpituuteen. Kun sitten kahdella hieman toisistaan poikkeavalla laserin aallonpituudella mitatut spektrit vähennetään toisistaan, fluoresenssitasot kumoavat toisensa ja jäljelle jää ramanspektrien erotus. Jälkikäsittelyn avulla erotuksesta voidaan muodostaa näytteelle ominainen ramanspektri. [21]

Ramanspekttriä mitattaessa yhden kanavan (yhden spektripisteen) signaali-kohinasuhde (signal-to-noise ratio, SNR) on muotoa

$$SNR_{\text{kanava}} = \frac{N_{\text{raman}}}{\sqrt{N_{\text{raman}} + N_{\text{fluor}} + N_{\text{tausta}}}}, \quad (3)$$

missä  $N_{\text{raman}}$  on ramansironneiden fotonien määrä,  $N_{\text{fluor}}$  on fluoresenssista syntyvien fotonien määrä ja  $N_{\text{tausta}}$  sisältää taustavalon sekä sensorin kohinan vaikutuksen. Kaavan (3) nimittäjä kuvaa kanavan raekohinaa, jota ei voida jälkikäsittelyllä spektristä poistaa, vaikka keskimääräiset arvot  $N_{\text{fluor}}$  ja  $N_{\text{tausta}}$  tunnettaisiinkin. Ramanspektri voidaan tehdä helpommin luettavaksi poistamalla siitä keskimääräinen fluoresenssitaso, mutta signaali-kohinasuhdetta tämä ei paranna. Tehokas menetelmä signaali-kohinasuhteen parantamiseksi on mittauksen aikaportitus, joka esitellään seuraavassa luvussa. [16]

## 2.4 Aikaportitettu ramanspektroskopia

1970-luvulta saakka ramanmittauksiin on kehitetty fluoresenssin vähennystapaa, joka perustuu ramansironnan ja fluoresenssin eri aikaiseen ilmentymiseen. Fotonin osuessa molekyyliin mahdollinen ramansironnasta tapahtuu erittäin nopeasti, alle yhden pikosekunnin viiveellä. Vastaavasti fluoresenssissa fotonin absorbtion ja emission välillä on viivettä muutamista pikosekunneista kymmeniin nanosekunteihin aineesta riippuen. Tästä fluoresenssin hitaudesta johtuen suuri osa fluoresenssia saadaan suljettua mittauksen ulkopuolelle käytettäessä pulssitettua laseria ja aikaportitettua mittausta. [23]

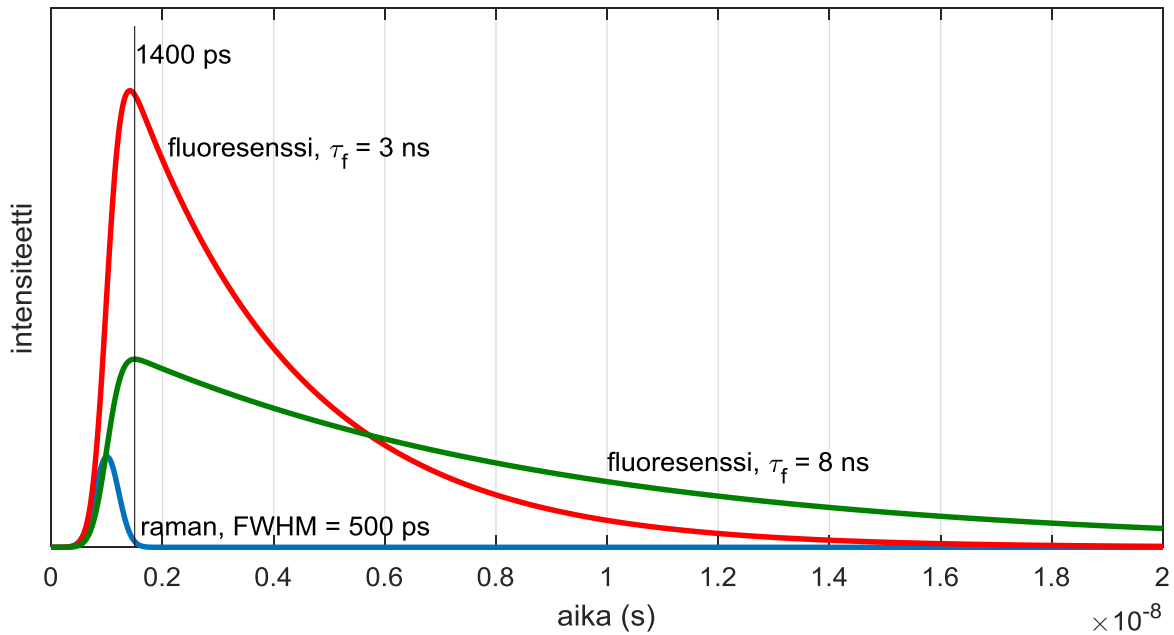
Ramansironnasta tapahtuu hyvin nopeasti verrattuna ramanspektroskopiassa käytettävien pulssitettujen laserien pulssin leveyteen. Tästä johtuen aikatasossa tarkasteltuna ramansironneiden fotonien aikajakauman muoto vastaa käytettävän laserin pulssin muotoa. Ramansironneiden fotonien aikajakauma voidaan siis esittää muodossa

$$N_{\text{raman}}(t) = C_r G(t), \quad (4)$$

missä  $G(t)$  on laserin pulssin muotoa kuvaava funktio ja  $C_r$  on vakiokerroin. Fluoresenssi voidaan mallintaa ajatellen sen nousevan huippuunsa äärettömän lyhyessä ajassa ja vähenevän takasin nollaan noudattaen eksponentiaalista vähenemistä aikavakiolla  $\tau_F$ . Fluoresenssissa emittoituvien fotonien aikajakauma saadaan laserpulssin muodon ja edellä mainitun eksponentiaalisen vähenemisen konvoluutiona ja on muotoa

$$N_{\text{fluor}}(t) = C_f \int_0^t G(\lambda) e^{-\left(\frac{t-\lambda}{\tau_F}\right)} d\lambda, \quad (5)$$

missä  $G(\lambda)$  on laserin pulssin muotoa kuvaava funktio,  $C_f$  on vakiokerroin ja  $\lambda$  on integroimismuuttuja. Kuvassa 2 on esitetty kaavojen (4) ja (5) mukaiset fotonien aikajakaumat, kun laserpulssi on Gaussin pulssi puoliarvon leveydellä 500 ps ja fluoresenssin aikavakioina ovat  $\tau_F = 3$  ns ja  $\tau_F = 8$  ns. Kuvan 2 kuvaajista koko 20 nanosekunnin ajalta laskettu fluoresenssi- ja ramanfotonien määrien suhdeluku on molemmilla fluoresenssin aikavakioilla noin 30. Mikäli sama suhdeluku lasketaan ottaen huomioon fotonit vain kuvaan 2 merkittyyn 1400 pikosekunnin aikarajaan saakka, aikavakiolla  $\tau_F = 3$  ns suhdeluku on noin neljä ja aikavakiolla  $\tau_F = 8$  ns suhdeluku on noin kaksi. Suhdeluku pienenee siis noin kymmenesosaan 20 nanosekunnin ajalta laskettuun verrattuna. Tällaisen aikaportituksen käyttö mittauksessa vähentää siis fluoresenssifotonien suhteellista osuutta kaikista havaituista fotoneista selvästi parantaen signaali-kohinasuhdetta. Esimerkiksi biologisissa näytteissä fluoresenssin aikavakiot ovat nanosekuntien suuruusluokassa [25]. Tällaisten näytteiden tapauksessa laserpulssin leveys on oltava korkeintaan satoja pikosekunteja, jotta fluoresenssia voidaan tehokkaasti vähentää. Lisäksi havaitaan, että samalla fluoresenssitasolla aikaportituksen teho paranee, kun fluoresenssin aikavakio kasvaa suhteessa käytetyn laserin pulssin leveyteen. Aikaportitettuun ramanmittaukseen on näin ollen syytä käyttää laseria, joka pystyy tuottamaan mitattavan näytteen fluoresenssin aikavakioon verrattuna lyhyitä pulsseja. [23]



Kuva 2. Fotonien aikajakaumat ramansironnassa ja fluoresenssissa.

Kuvaan 2 merkitty aikaraja 1400 ps on vain esimerkkiarvo eikä tuota välttämättä parasta signaali-kohinasuhdetta mittaukseen. Todellisessa mittauksessa optimaalisen aikaikkunan leveys riippuu käytetyn laserin pulssin leveydestä sekä mitattavan näytteen fluoresenssitasosta ja fluoresenssin aikavakiosta [22].

Aikaportitettua ramanspektroskopiaa on kehitetty muun muassa optiseen Kerr-porttiin sekä aikaportitettuun valomonistinputkeen, ICCD-kameraan ja CMOS SPAD -ilmaisimeen perustuen. Kerr-porttia lukuun ottamatta aikaportitus on toteutettu joko ohjaamalla sensoria päälle ja pois päältä halutun aikaportin mukaan tai mittaamalla fotonien osumahetket laajemmalla ajanjaksolla ja valitsemalla jatkokäsittelyyn vain aikaporttiin osuneet havainnot.

Kerr-portin tapauksessa aikaportitus perustuu aineen valonläpäisykyvyn modulointiin. Käytetyn aikaportin minimileveys näissä tekniikoissa on vaihdellut noin 50-700 pikosekunnin suuruusluokassa suurimpana poikkeuksena Kerr-portilla toteutettu vain 4 pikosekunnin mittainen aikaportti. [6, 16, 23, 24, 26, 29]

Fluoresenssin vähentämisen lisäksi aikaportituksella voidaan saavuttaa muutakin hyötyä. Sopivaa aikaportitusta käyttäen on voitu mitata ramanspektri näytteen pintaa syvemmältä ilman pintakerroksen suurta vaikutusta mittaustulokseen. Mikäli mittauksia halutaan tehdä laboratorio-olosuhteiden ulkopuolella, aikaportitus vähentää myös ympäristöstä tulevan hajavalon vaikutusta tuloksiin. Myöhemmin tässä työssä tarkastellaan lähemmin aikaportitusta käyttäen CMOS SPAD -sensoripiiriä, joka voisi hinnan ja koon myötä soveltua edellä mainituista vaihtoehtoista parhaiten juuri muualla kuin kiinteässä laboratoriossa tehtäviin mittauksiin [16]. [26, 20]

### 3 AIKAPORTITETUT SPAD-ILMAISIMET RAMANSPEKTROSKOPIASSA

#### 3.1 SPAD-ilmaisimien

Valomonistinputkeen ja CCD-kennoon verrattuna CMOS SPAD -ilmaisimien käyttö mahdollistaa valoilmalmaisimien ja aikavälinmittauspiirien valmistamisen samalle integroidulle piirille. Tämä pienentää laitteiston kokoa ja tekee integroidun piirin ulkopuolisen laitteiston yksinkertaisemmaksi.

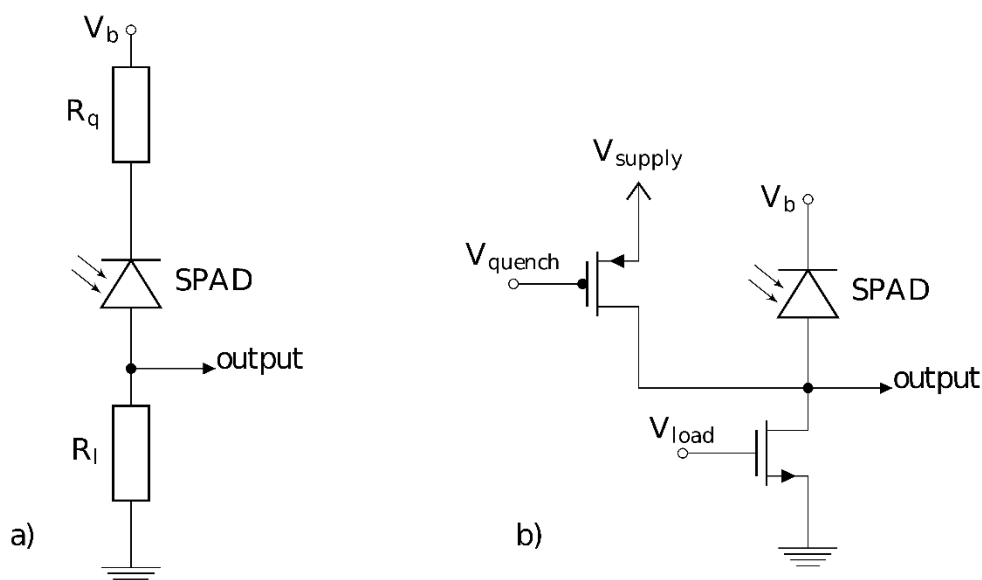
SPAD-ilmaisimien on perusrakenteeltaan diodi eli pn-liitos. Kun estosuuntainen jännite SPAD-valodiodin yli on kyseiselle diodille ominaista läpilyöntijännitettä suurempi, SPAD-ilmaisimen sanotaan olevan Geiger-moodissa. Tällöin yksikin tyhjennysalueelle tuleva varauksenkuljettaja synnyttää ketjureaktion myötä uusia varauksenkuljettajia ja tapahtuu avalanche-läpilyönti, jossa diodin läpi kulkeva virta kasvaa nopeasti milliampeerien luokkaan. Mikäli läpilyönnin aiheuttava ensimmäinen varauksenkuljettaja syntyy fotonin absorboitumisesta tyhjennysalueella, virtapulssin alkuhetki ilmaisee ajanhetken, jolla fotoni osuu SPAD-ilmaisimeen. [27]

Yksittäisiä CMOS SPAD -ilmaisimia on tehty  $0,8\ \mu\text{m}$  CMOS-teknologialla jo noin 15 vuotta sitten [28]. Viimeisten viiden vuoden aikana tehdyt ramanspektroskopiaan soveltuvat SPAD-matriisit on valmistettu  $0,35\ \mu\text{m}$  CMOS-teknologialla [6, 29] tai kuvasensoreiden valmistukseen optimoidulla  $0,13\ \mu\text{m}$  CMOS-teknologialla [31].

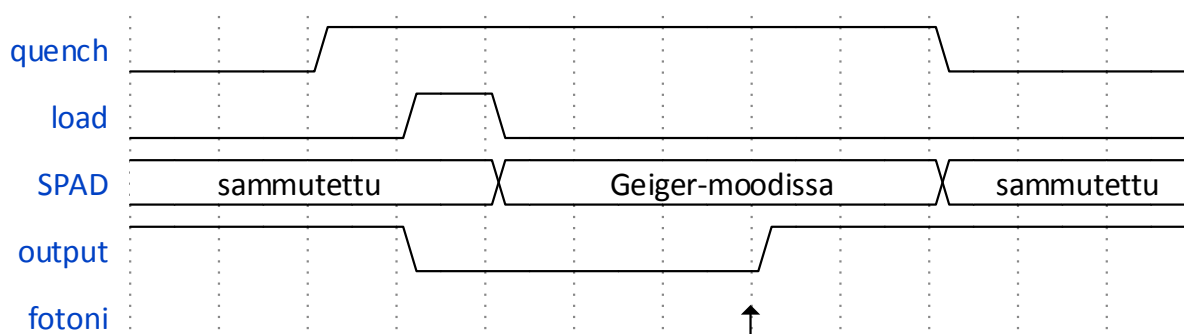
SPAD-ilmaisimien ei ole ideaalinen yksittäisten fotonien ilmaisimien. Todellista SPAD-ilmaisinta käytettäessä osa fotoneista ei aiheuta läpilyöntiä ja näin ollen jäävät ilmaisematta. Siis fotonilmaisutodennäköisyys PDE (Photon Detection Efficiency) on alle 100%. Toisaalta termisestä elektroni-aukkoparien synnystä johtuen ilmaisuja tapahtuu silloinkin, kun ilmaisimelle ei tule lainkaan fotoneja. Näiden ei-toivottujen ilmaisujen määrän aikayksikössä kertoo pimeäliipaisutahti DCR (Dark Count Rate). Lisäksi fotonin absorption ja havaittavan virtapulssin välillä syntyy ajallista poikkeamaa, joka vaihtelee muun muassa fotonin absorptiopaikan mukaan [32]. Fotonin ilmaisun ajallista epätarkkuutta tarkoittava termi on jitteri. Jitterin myötä ideaalisen lyhyitä ja tarkasti samalle ajanhetkelle sijoittuvia valopulsseja havainnoitaessa havainnot eivät osu aika-akselilla tarkasti samaan pisteeseen vaan muodostavat jakauman, jonka puoliarvon leveydellä jitterin suuruutta yleensä kuvataan. Esimerkiksi  $150\ \text{nm}$  CMOS-teknologialla valmistettujen neliön muotoisten (sivun pituus  $10\ \mu\text{m}$ ) SPAD-ilmaisimien kohdalla edellä mainittujen suorituskypparametrien arvojen on raportoitu olevan suuruusluokaltaan seuraavaa: läpilyöntijännite  $18,2\ \text{V}$ , PDE näkyvällä valolla 5-30%, DCR 20-200 Hz ja jitteri 50 ps (FWHM) [33]. [27]

Tapahtuneen läpilyönnin jälkeen avalanche-virta kulkee SPAD-ilmaisimen läpi, kunnes se sammutetaan joko passiivista tai aktiivista sammutuspiiriä käyttäen. Esimerkki passiivisesta sammutuspiiristä on kuvassa 3 a) [27]. Piirin toimintaperiaate on seuraava. Jännite  $V_b$  on läpilyöntijännitettä suurempi ja SPAD-ilmaisimien on Geiger-moodissa. Läpilyönnin tapahtuessa piirissä kulkee hetkellisesti suuri virta kapasitansseista (diodin kapasitanssi, parasiittiset kapasitanssit) johtuen. Kapasitanssien purkauduttua virta tasoittuu vastusten määräämälle tasolle. Kun tämä taso on alle raja-arvon, joka on noin  $100\ \mu\text{A}$ , avalanche-virta sammuu itsestään ja piiri palaa alkutilaansa. Vastus  $R_1$  voidaan mitoittaa sen mukaan, että läpilyönnissä syntyvästä virtapulssista saadaan sopiva jännitesignaali ja  $R_q$  riittävän suureksi, jotta avalanche-virta sammuu. [27]

Passiivisen sammutuspiirin vastuksista ja kapasitansseista määräytyvä aikavakio rajoittaa fotonien osuma-aikojen mittauksen tiheimmillään noin 50000 mittaukseen sekunnissa [27]. Nopeampi yhdellä NMOS- ja yhdellä PMOS-transistorilla toteutettu aktiivinen SPAD-ilmaisimen sammutuspiiri on esitetty kuvassa 3 b). Jännitteet  $V_b$  ja  $V_{supply}$  on valittava siten, että  $V_b$  ylittää diodin läpilyöntijännitteen, mutta erotus  $V_b - V_{supply}$  ei. Näin valituilla jännitteillä SPAD-ilmaisimen toimintatila Geiger-moodiin ja siitä pois voidaan ohjata ohjaussignaaleilla  $V_{quench}$  ja  $V_{load}$  kuvan 4 mukaisesti. SPAD-ilmaisimella pidetään sammutettuna ohjaussignaalin arvoilla  $V_{quench} = V_{load} = 0$  V, jolloin PMOS-transistori on johtavassa tilassa ja NMOS-transistori johtamattomassa tilassa. Tällöin jännite SPAD-ilmaisimen yli on  $V_b - V_{supply}$ , joka on pienempi kuin läpilyöntijännite. SPAD-ilmaisimella saadaan Geiger-moodiin asettamalla ensin PMOS-transistori johtamattomaksi ohjausjännitteellä  $V_{quench} = V_{supply}$  ja tämän jälkeen NMOS-transistori johtavaksi ohjausjännitteellä  $V_{load} = V_{supply}$ , jolloin jännite SPAD-ilmaisimen yli on läpilyöntijännitteen ylittävä  $V_b$ . Seuraavaksi myös NMOS-transistori palautetaan johtamattomaan tilaan. Piirin kapasitanssien vuoksi SPAD-ilmaisimen anodille jää jännitteeksi 0 V ja ilmaisimella on yhä Geiger-moodissa. Mikäli SPAD-ilmaisimessa tapahtuu nyt läpilyönti, se havaitaan anodin (kuvan 3 b) output) jännitteen noususta. Mikäli läpilyöntiä ei tapahdu, lähdessä havaitaan jännitepulssi viimeistään silloin, kun piiri palautetaan takaisin lähtötilaansa. [29]



Kuva 3. SPAD-ilmaisimen a) passiivinen ja b) aktiivinen sammutuspiiri.



Kuva 4. SPAD-ilmaisimen ohjaus aktiivisella sammutuspiirillä.

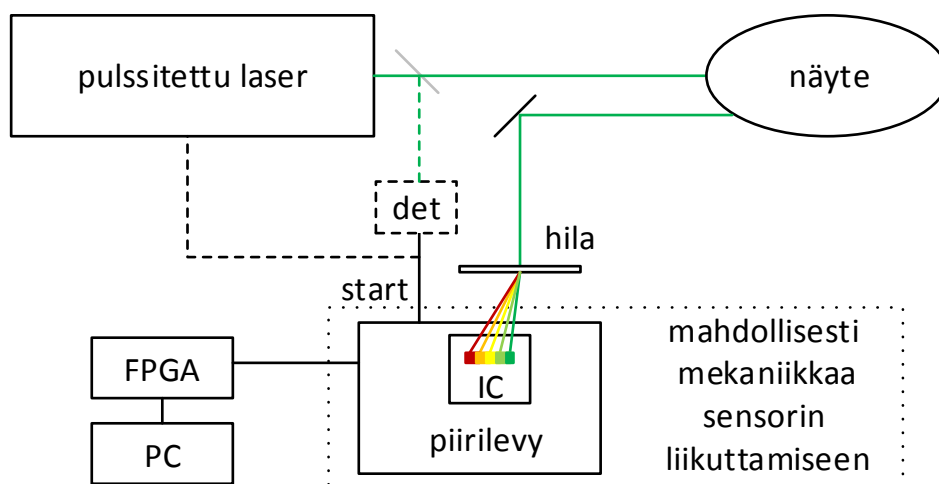


### 3.2 SPAD-ilmaisimeen perustuva ramanspektrometri

Olemassa olevien SPAD-ilmaisimia käyttävien ramanspektrometrien perusrakenne on esitetty kuvassa 5. Laserpulssit ja sensorin aikaportitus tahdistetaan samaan tahtiin laserilta tulevalla aloitussignaalinalla, jota voidaan kuljettaa joko sähköisenä tai optisena signaalina. Laitteistossa voidaan lisäksi käyttää erilaisia sähköisiä ja optisia viive-elementtejä, joilla sähköisen ja optisen signaalitien viiveet säädetään siten, että sensorin aikaportitus osuu haluttuun ajankohtaan. Tämän työn mittauksissa käytetyn laserin pulssin leveys on 150 ps (FWHM) ja pulssitahti noin 350 kHz.

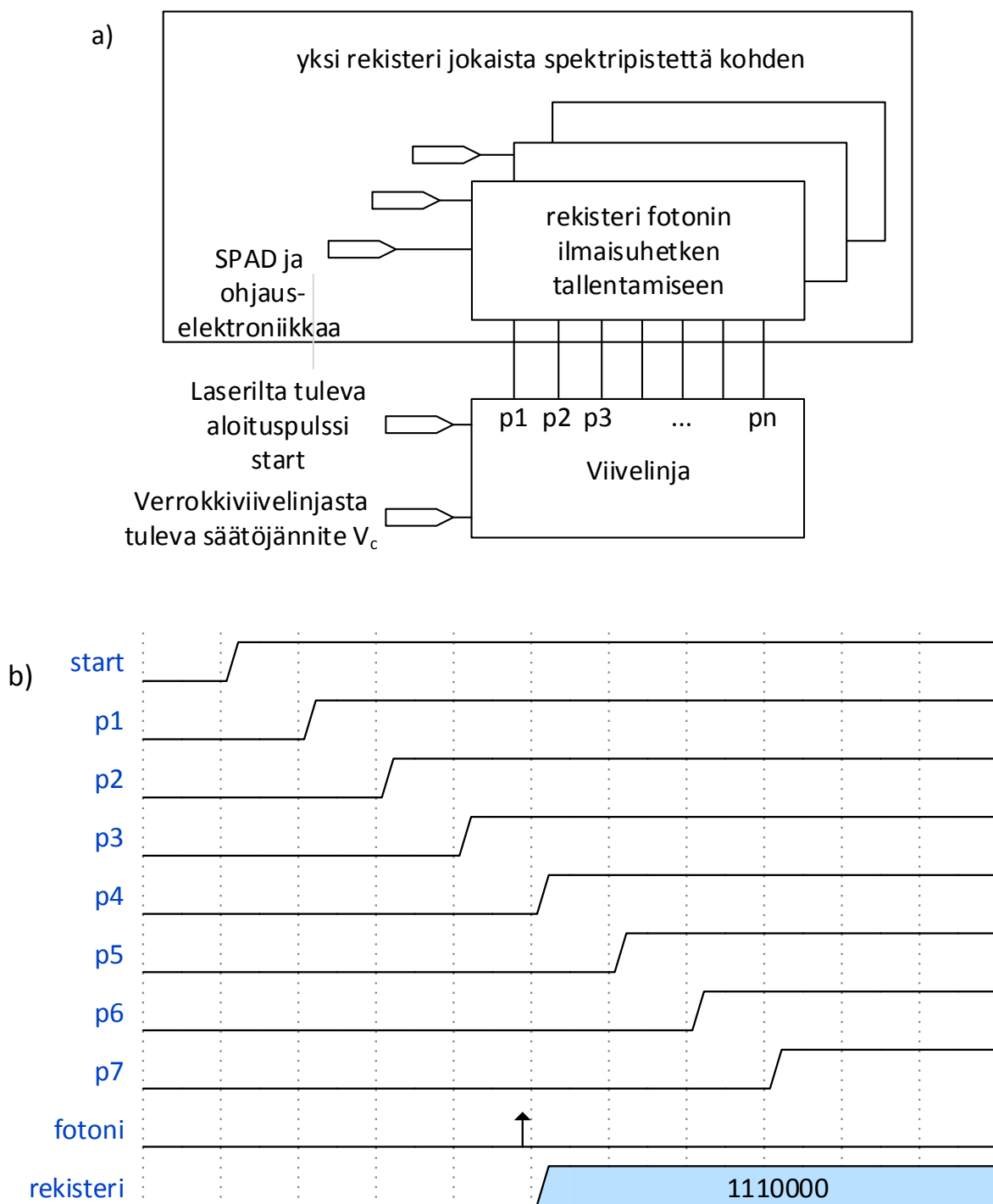
Ensimmäisissä SPAD-ilmaisimella toteutetuissa ramanspektrometreissä sensorina on käytetty yhtä SPAD-ilmaisinta ja ramanspektri on kerätty liikuttaen sensoria käsin tai askelmoottorilla. Aikaportitus on näissä laitteistoissa toteutettu joko integroidulla kiinteällä aikaportilla tai aktiiviseen sammutuspiiriin ja kokonaan ulkoisiin ajoitussignaaleihin pohjautuen. Myös mittausdatan muodostamiseen on tarvittu erillistä TDC-laitteistoa (Time-to-Digital Converter) tai oskilloskooppia. [10, 30, 34]

Sensorin mekaanisesta liikuttamisesta on päästy eroon käyttämällä sensorina yhden SPAD-ilmaisimen sijaan 128, 256 tai 1024 rivistä muodostuvaa SPAD-matriisia. Näissä toteutuksissa SPAD-matriisien kanssa samalle piirille on integroitu vähintäänkin aikaportin leveyden säätö tai ulkoisesti tuotettujen ajoitussignaalien avulla toimiva fotonien osumahetken määrittäminen [5, 6]. Piirille on voitu integroida myös monikanavainen TDC-piiri, jonka resoluutio on suuruusluokkaa 100 – 300 ps [29, 31].



Kuva 5. SPAD-ilmaisimeen perustuvan ramanspektrometrin rakenne.

Esimerkki SPAD-matriisin kanssa samalle piirille integroidun monikanavaisen TDC-piirin rakenteesta on esitetty kuvassa 6 a). Rakenne vastaa tämän työn mittauksissa käytetyn sensorin rakennetta. Pulssitettu laser antaa aloitussignaalin, josta viivelinjassa muodostetaan viivästetyt versiot  $p_1, p_2 \dots p_n$ . Fotonin havaitsemishetkellä rekisteriin tallennetaan viivesignaalien arvot, joista fotonin osumahetki käy ilmi. Signaalit ja fotonin havaitsemishetkellä rekisteriin tallentuva arvo on esitetty yhden kanavan osalta kuvassa 6 b). Kuvassa 6 b) fotoni havaitaan silloin, kun signaalilla  $p_3$  on jo arvo 1, mutta signaalilla  $p_4$  on vielä arvo 0. Tällöin rekisteriin tallentuu arvo 1110000. Näin toimivan TDC-piirin mittausalueen laajuus ja resoluutio määräytyvät viivelinjan ominaisuuksista. [29]



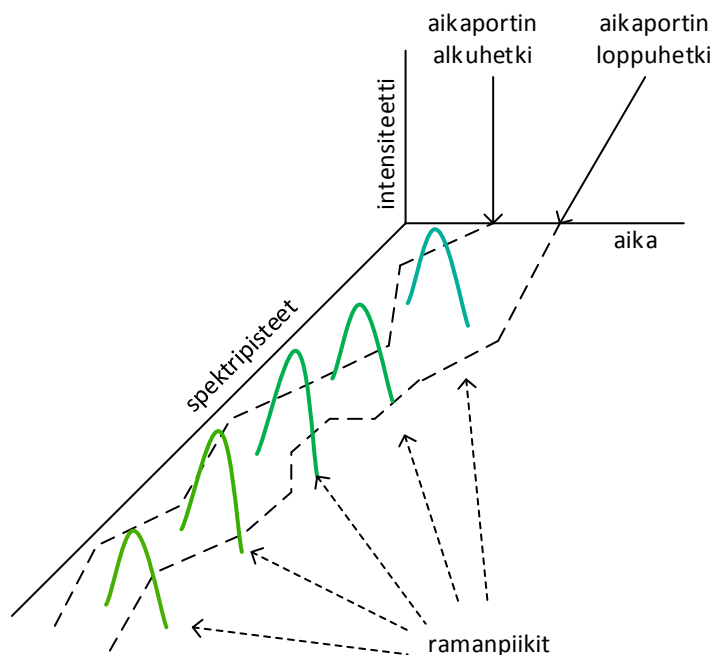
Kuva 6. a) Aikaerotteinen fotonien ilmaisu monikanavaisessa SPAD-sensoripiirissä ja b) signaalien ajoituskaavio yhdessä kanavassa.

## 4 AIKAEROTTEISEN SENSORIN AJOITUSVIRHEET

Aikavälinmittauspiireihin (lyhyemmin TDC-piireihin) liittyen tässä työssä käytetään seuraavaa termistöä. Aikavälinmittauspiirin lähtöarvoihin viitataan termillä aika-arvo. Ensimmäisen ja viimeisen samaksi aika-arvoksi muuntuvan ajanhetken välisen ajanjakson pituuteen viitataan termillä aika-arvon pituus. Ensimmäisen ja viimeisen samaksi aika-arvoksi muuntuvan ajanhetken keskiarvoon viitataan termillä aika-arvon paikka. Ajoitusvirheellä viitataan aika-arvojen paikkojen ja leveyksien vaihteluun sensorin kanavien välillä, aika-arvojen leveyksien vaihteluun yksittäisessä kanavassa sekä aikaportin alku- ja loppuhetken vaihteluun kanavien välillä. Ajoitusdatalla viitataan tietoon aika-arvojen paikoista ja leveyksistä.

### 4.1 Ajoitusvirheiden syyt

Monikanavaisella SPAD-matriisilla mitatussa ramanspektrissä on havaittu olevan enemmän virhettä kuin saman matriisin yhdellä mekaanisesti liikutellulla SPAD-ilmaisimella mitatussa spektrissä [5]. Tämä on seurausta kanavien välisistä poikkeamista. Monikanavainen sensoripiiri on niin laaja kokonaisuus, että komponenttien ja johdotusten epäsovituksista johtuen kanavista ei saa tehtyä täysin identtisiä. Esimerkiksi kuvan 6 a) mukaisessa rakenteessa yhdestä viivelinjasta jaetaan signaalit kymmeniin tai satoihin rekistereihin ja on käytännössä mahdotonta toteuttaa johdotusta jokaiselle rekisterille juuri samalla tavalla. Epäsovituksen seurauksena aikaportitettussa mittauksessa kanavien todellisten aikaikkunoiden paikat ja koot vaihtelevat ja tämä vaikuttaa havaittavien fotonien määrään. Aikaportituksen ajoitusvirheen periaate on esitetty kuvassa 7. Kuvan 7 tapauksessa osa ramanpiikeistä sopii kokonaan aikaportin alueelle, mutta esimerkiksi alimman ramanpiikin aikajakauman lopusta jää iso osa aikaportin ulkopuolelle. Tämä vaihtelu vääristää mitattua spektriä ja vääristymä on erityisen suurta haastavilla, voimakkaasti fluoresoivilla näytteillä. SPAD-ilmaisimien kanssa samalle integroidulle piirille tehdyillä aikavälinmittauspiireillä aikaportin loppuhetken vaihteluvälin on mitattu olevan enimmillään noin 150 ps [29].



Kuva 7. Aikaportituksen ajoitusvirheen periaate.

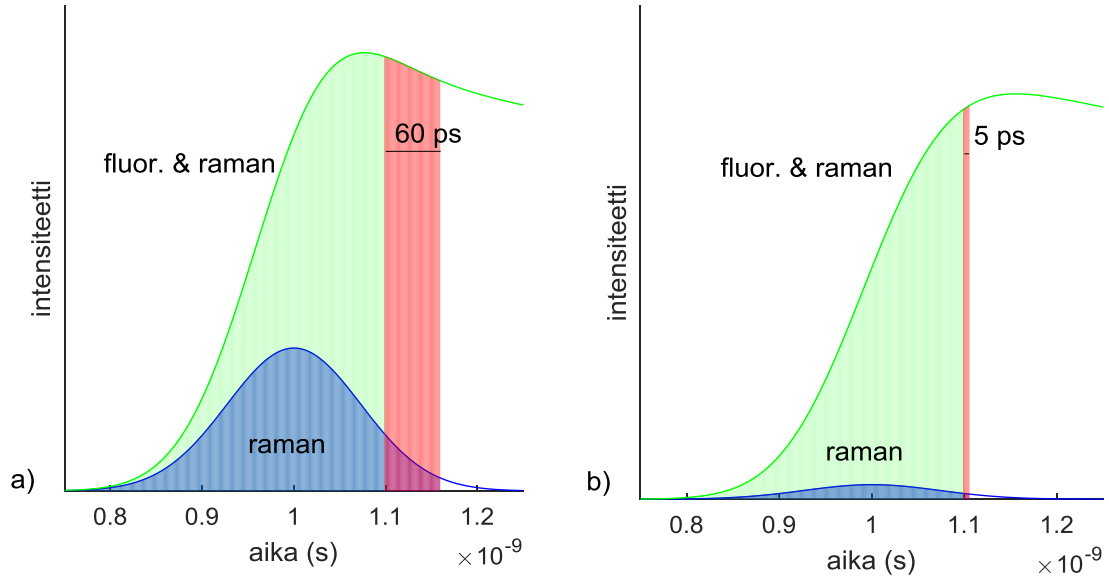
## 4.2 Ajoitusvirheiden vaikutus ramanspektriin

Ramanspektrin parhaan signaali-kohinasuhteen saavuttamiseksi mittauksen aikaportti kannattaa sijoittaa niin, että ramanpulssin alkuosasta ei fotoneja jää havaitsematta [22]. Mikäli mittausaluetta on riittävästi käytössä, laserpulssi voidaan ajoittaa niin, että ajoitusvirheistä huolimatta aikaportin avaus tapahtuu aina ennen laserpulssin etureunaa. Näin toimittaessa ajoitusvirheillä aikaportin alkuhetkessä on merkittävää vaikutusta spektriin ainoastaan silloin, kun signaalitaso on niin heikko, että sensorin oma kohina näkyy spektrissä merkittävästi.

Signaali-kohinasuhteen kannalta optimaalisen aikaportin leveys riippuu mitattavasta näytteestä, mutta on (alkuhetken ollessa laserpulssin alkuhetkellä) noin 1-2 kertaa käytettävän laserpulssin puoliarvon leveys [22]. Tästä aikaportin leveydestä seuraa, että aikaportin loppuhetkellä näytteestä tulevan fluoresenssin taso on lähellä huippuaan. Mikäli mitattava näyte on voimakkaasti fluoresoiva, poikkeama aikaportin loppuhetkessä voi vaikuttaa havaittujen fotonien kokonaismäärään paljon. Kuvassa 8 on esitetty kaavojen (4) ja (5) mukaiset jakaumat ramansironneille fotoneille sekä fluoresenssista ja ramansironnasta yhteensä havaittaville fotoneille. Kuvassa laserpulssin puoliarvon leveys on 150 ps ja fluoresenssin aikavakio  $\tau_F = 2$  ns. Kuvassa 8 a) ilman aikaporttitusta laskettu fluoresenssi- ja ramanfotonien määrien suhdeluku on  $R_{F/R} = 33$  ja kuvassa 8 b)  $R_{F/R} = 333$ . Kuviin punaisella merkityn alueen leveys kuvaa aikaportin loppuhetken poikkeamaa optimaalisesta loppuhetkestä. Kuvissa 8 a) ja 8 b) sinisen ja punaisen alueen pinta-alat ovat yhtä suuret eli  $R_{F/R}$ -suhteesta riippuen 60 ps tai 5 ps ajoitusvirhe aikaportin loppuhetkessä vaikuttaa havaittujen fotonien määrään saman verran kuin ramansironnasta koko pulssin aikana.

Aikaportin loppuhetkessä olevan ajoitusvirheen vaikutus ramanspektriin on esitetty kuvassa 9. Kaikissa kuvissa 9 a) – 9 j) spektrit on piirretty käyttäen kuvan 8 mukaista laserpulssia, fluoresenssin aikavakiota ja aikaportin loppuhetkeä. Kuvissa 9 a) ja 9 f) on esitetty kolmesta ramanpiikistä muodostuvat spektrit fluoresenssin ja ramansironnan suhdeluvuilla 33 ja 333 ilman ajoitusvirhettä. Toisella rivillä aikaportin loppuhetkeen on lisätty satunnaista vaihtelua 2 ps keskihajonnalla ja kolmannella rivillä 10 ps keskihajonnalla. Neljännellä rivillä aikaportin loppuhetkeen on lisätty virhettä, joka kasvaa lineaarisesti 1 ps/spektripiste. Viidennellä rivillä aikaportin loppuhetkeen vaikuttaa sekä lineaarisesti muuttuva virhe (1 ps/spektripiste) että satunnainen virhe (keskihajonta 10 ps).

Kuvista 8 ja 9 havaitaan, että aikaportin ajoitusvirheen aiheuttama spektrin vääristymä on selvästi pahempaa voimakkaasti fluoresoivalla näytteellä. Aikaportin pidentäminen moninkertaiseksi vähentää ajoitusvirheen vaikutusta spektriin, mutta koska tällöin menetetään aikaporttituksen alkuperäinen tavoite eli fluoresenssin vähentäminen mahdollisimman pieneksi ei aikaportin pidennystä tässä tarkastella yksityiskohtaisemmin. Kuvien 9 g) ja 9 i) perusteella lineaarisesti muuttuva ajoitusvirhe ei ole spektrin luettavuuden kannalta yhtä paha ongelma kuin spektripisteestä toiseen satunnaisesti vaihteleva virhe.



Kuva 8. Aikaportituksen ajoitusvirhe fluoresenssin ja ramansironnan suhteella a) 33, b) 333.

Eräs ajoitusvirheen muoto ja siitä seuraava spektrin vääristyminen on esitetty kuvassa 10. Kuvassa 10 esitetty ramanpiikin ja ajoitusvirheestä johtuvan piikin korkeuksien suhde  $R_{R/E}$  riippuu ajoitusvirheen suuruudesta sekä näytteen  $R_{F/R}$ -suhteesta ja fluoresenssin aikavakiosta. Koska suhde  $R_{R/E}$  kuvastaa spektrin luettavuutta, olisi sen suuruutta hyödyllistä kyetä arvioimaan ajoitusvirheen suuruudesta ja näytteiden ominaisuuksista lähtien. Johdetaan seuraavaksi approksimaatiokaava, jolla suhteen  $R_{R/E}$  arvolle voidaan laskea likiarvo, kun ajoitusvirheen määrä ja näytteen ominaisuudet tunnetaan. Kaavan johdossa esiintyvät symbolit on esitetty kuvassa 11.

Taulukkoon 1 on laskettu pinta-alojen ja huipun korkeuksien suhteet  $R_{A/H}$  fluoresenssista ja ramansironnasta yhteensä havaittavien fotonien aikajakaumista eri fluoresenssin aikavakion arvoilla  $\tau_f$  sekä fluoresenssi- ja ramanfotonien suhdeluvuilla  $R_{F/R}$ . Simuloinneissa käytetyn laserpulssien leveys on 150 ps (FWHM). Taulukon 1 tulosten perusteella suhdeluvun  $R_{A/H}$  ja aikavakion  $\tau_F$  (ps) välillä pätee yhteys

$$R_{A/H} = \frac{A_R + A_F}{H} = 2,28 \cdot \tau_F^{0,91}, \quad (6)$$

missä  $A_R$  on yhden laserpulssin tuottamien ramanfotonien kokonaismäärä,  $A_F$  on yhden laserpulssin tuottamien fluoresenssifotonien kokonaismäärä ja  $H$  on fotonien ( $A_R + A_F$ ) aikajakauman huippuarvo. Taulukon 1 yliviivatuissa soluissa kaavalla (6) lasketussa suhdeluvussa  $R_{A/H}$  on virhettä yli 15%, keltaisissa soluissa 10-15% ja valkoisissa soluissa alle 10%.

Lähteen [22] perusteella valittuja aikaportin paikkoja simuloimalla voidaan arvioida, että optimaalista aikaportitusta käytettäessä havaittujen ramanfotonien määrä

$$N_R \approx 0,8A_R. \quad (7)$$

Simulointien perusteella kaavalla (7) lasketussa ramanfotonien määrässä  $N_R$  voi olla virhettä enintään  $\pm 20\%$ . Virhe johtuu optimaalisen aikaportin leveyden vaihtelusta näytteen ominaisuuksien mukaan.

Kun suhdeluku  $R_{F/R} \geq 10$ , voidaan tehdä approksimaatio  $A_R + A_F \approx A_F$ , niin että summan  $A_R + A_F$  arvoon tulee approksimaatiosta virhettä alle  $10\%$ . Mikäli  $R_{F/R} < 10$ , fluoresenssi ei ylipäättään ole merkittävä ongelma eikä tätä tapausta tarkastella tarkemmin. Käyttämällä edellä mainittua approksimaatiota kaavaan (6) saadaan fotonien aikajakauman huippuarvolle lauseke

$$H = \frac{A_F}{2,28 \cdot \tau_F^{0,91}}. \quad (8)$$

Simulointien mukaan fotonien aikajakauman arvo optimaalisella aikaportin päättymishetkellä on noin  $85\%$  aikajakauman huippuarvosta. Erilaisten näytteiden erilaisesta optimaalisesta aikaportista johtuen tässä arvioissa voi olla virhettä enintään  $\pm 20\%$ . Merkitsemällä aikaportin loppuhetkessä olevasta ajoitusvirheestä  $S$  (ps) johtuvaa virhettä fotonien määrässä merkinnällä  $N_E$  ja käyttämällä edellä mainittua  $85$  prosentin arviota, saadaan fotonien määrässä olevalle virheelle lauseke

$$N_E = 0,85 \cdot \frac{A_F}{2,28 \cdot \tau_F^{0,91}} \cdot S. \quad (9)$$

Käytetään ramanfotonien  $N_R$  ja fotonien määrässä olevan virheen  $N_E$  suhteelle merkintää  $R_{R/E}$ . Kaavojen (7) ja (9) perusteella

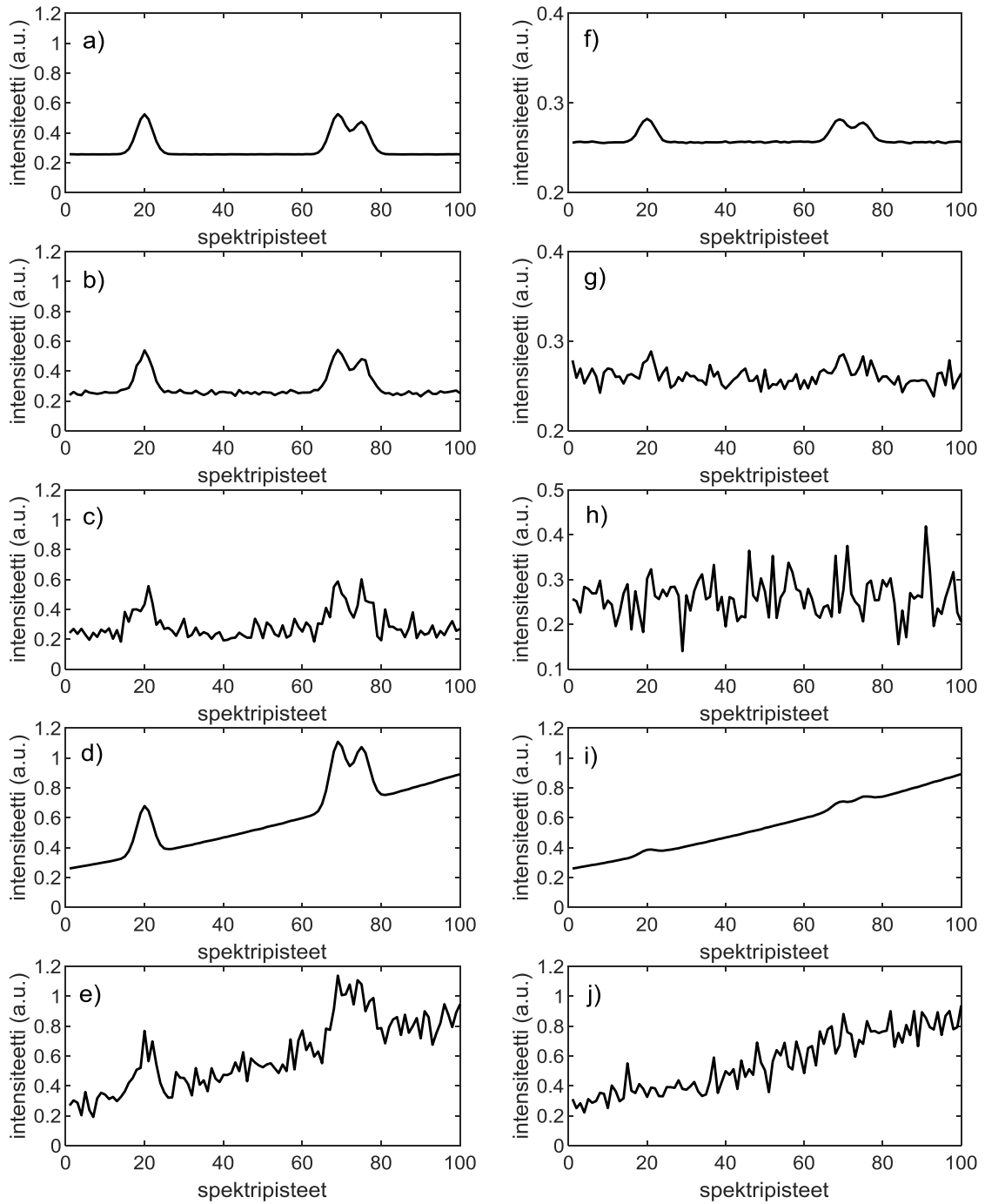
$$R_{R/E} = \frac{N_R}{N_E} = \frac{0,8A_R}{0,85 \cdot \frac{A_F}{2,28 \cdot \tau_F^{0,91}} \cdot S} = \frac{2,15 \cdot \tau_F^{0,91}}{S} \cdot \frac{A_R}{A_F} = \frac{2,15 \cdot \tau_F^{0,91}}{S \cdot R_{F/R}}. \quad (10)$$

Suhdeluku  $R_{R/E}$  kuvaa ramansironnasta syntyneen spektriipiikin ja ajoitusvirheestä johtuvan spektriipiikin korkeuksien suhdetta, joten kaavalla (10) voidaan arvioida spektrin luettavuutta näytteen ominaisuuksien ja ajoitusvirheen suuruuden avulla. Kaavasta (10) voidaan myös ratkaista ajoitusvirheen suuruus  $S$  ja arvioida suurinta mahdollista ajoitusvirhettä, jolla tietystä näytteestä saadaan vielä luettavissa oleva spektri.

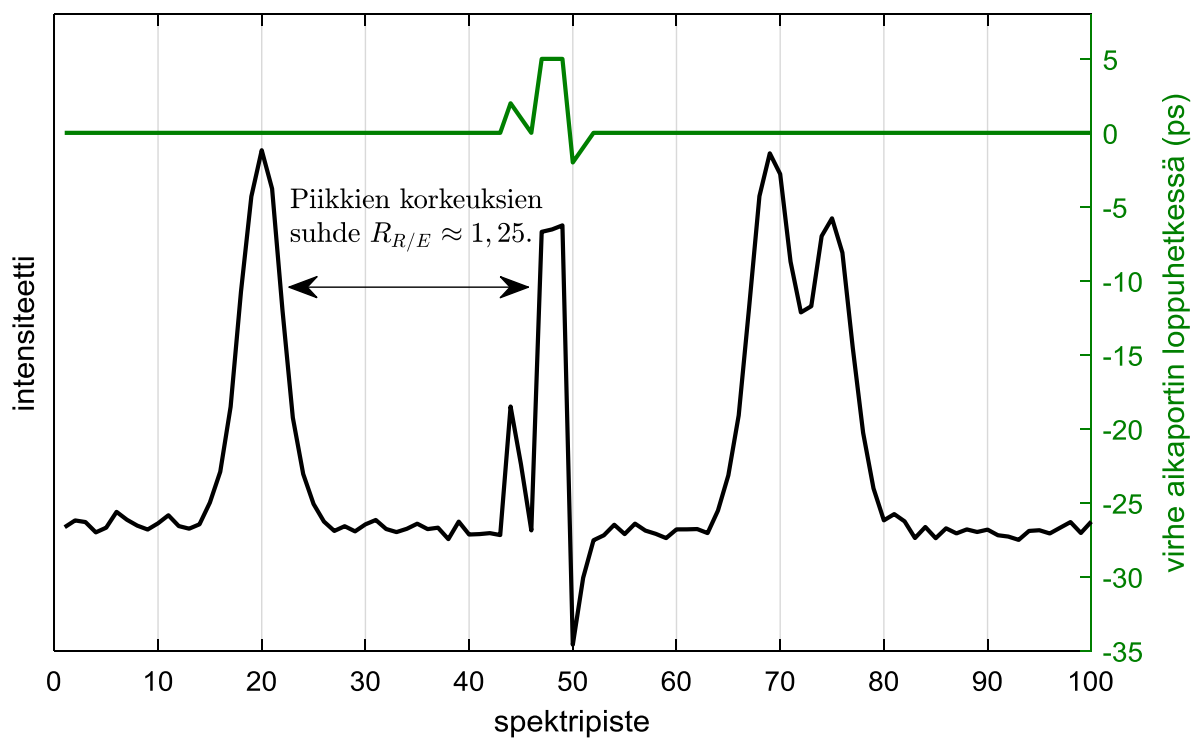
Kaavaa (10) ei kannata käyttää taulukossa 1 yliviivattuja soluja vastaaviin näytteisiin suuren virheen takia. Toisaalta näiden näytteiden kohdalla fluoresenssi on niin vähäistä, että ajoitusvirheiden tarkempi käsittely ei luultavasti ole muutenkaan tarpeen.

Taulukko 1. Fotonien aikajakaumista lasketut alan ja huipun korkeuden suhdeluvut

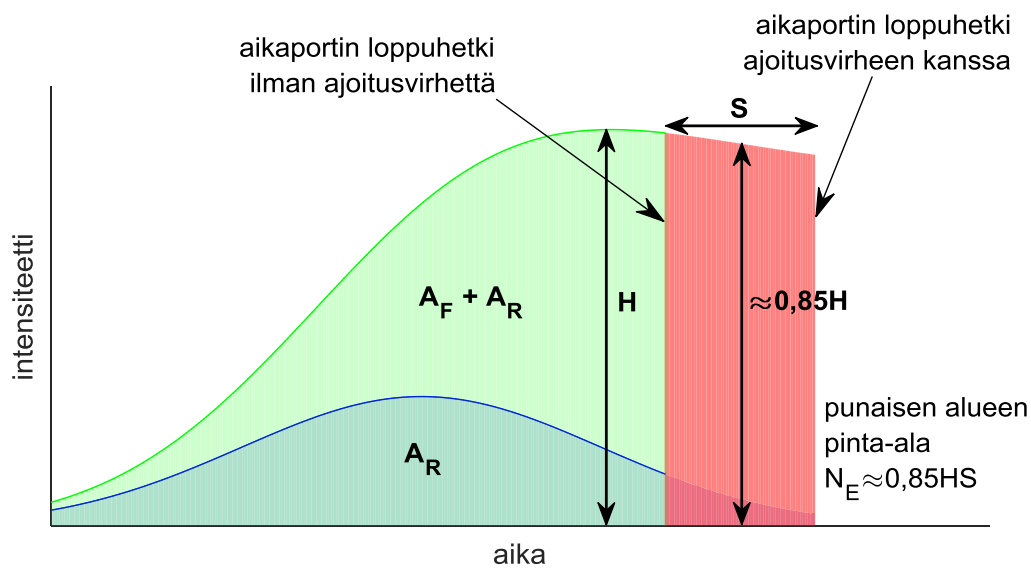
$\tau_F$ (ps)	$R_{A/H}$ $R_{F/R} = 1000$	$R_{A/H}$ $R_{F/R} = 333$	$R_{A/H}$ $R_{F/R} = 100$	$R_{A/H}$ $R_{F/R} = 33$	$R_{A/H}$ $R_{F/R} = 10$
400	571	571	570	568	546
700	879	879	878	871	786
1000	1186	1186	1184	1165	973
2000	2199	2198	2189	2055	
4000	4213	4210	4133		
7000	7224	7209	6649		
10000	10229	10180			
16000	16200	15822			



Kuva 9. Simuloidut ramanspektrit, joissa a) fluoresenssin ja ramansironnan suhde  $R_{F/R} = 33$ , ei ajoitusvirheitä b)  $R_{F/R} = 33$ , satunnaisen ajoitusvirheen keskihajonta  $\sigma_E = 2$  ps c)  $R_{F/R} = 33$ ,  $\sigma_E = 10$  ps, d)  $R_{F/R} = 33$ , lineaarinen ajoitusvirhe 1 ps/spektripiste, e)  $R_{F/R} = 33$ , lineaarinen ajoitusvirhe 1 ps/spektripiste ja  $\sigma_E = 10$  ps, f)  $R_{F/R} = 333$ , ei ajoitusvirheitä, g)  $R_{F/R} = 333$ ,  $\sigma_E = 2$  ps, h)  $R_{F/R} = 333$ ,  $\sigma_E = 10$  ps, i)  $R_{F/R} = 333$ , lineaarinen ajoitusvirhe 1 ps/spektripiste ja j)  $R_{F/R} = 333$ , lineaarinen ajoitusvirhe 1 ps/spektripiste ja  $\sigma_E = 10$  ps. Kaikissa kohdissa  $\tau_F = 2$  ns.



Kuva 10. Aikaportin loppuhetkessä olevan vaihtelun vaikutus ramanspektriin.



Kuva 11. Kaavan (10) johdannossa käytettyjen symbolien graafinen esitys.



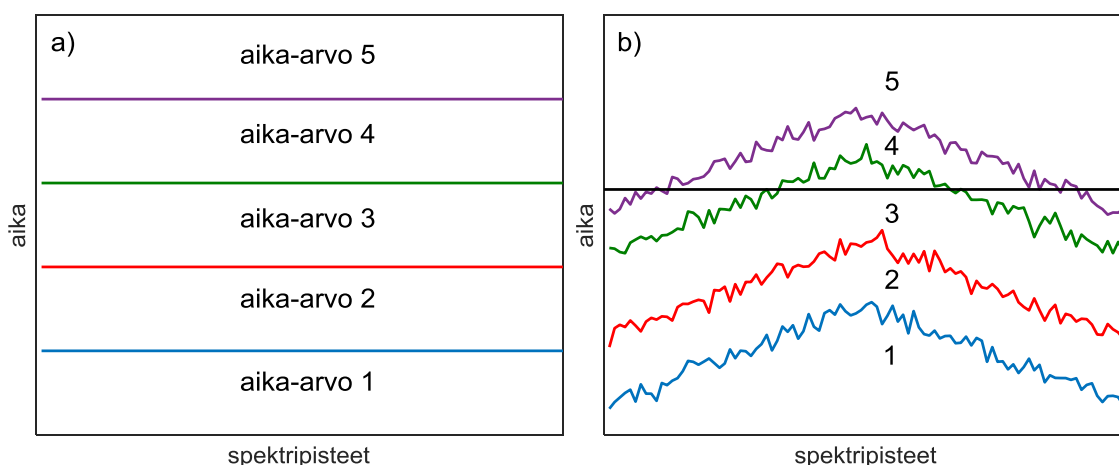
## 5 AJOITUSVIRHEIDEN MÄÄRITYS JA KOMPENSOINTI

### 5.1 Ajoitusvirheiden määrittäminen

Ideaalitilanteessa, kun ajoitusvirheitä ei ole, fotonien osumahetki  $t$  voidaan mitata sensorin aikavälinmittauspiireillä kuvan 12 a) mukaisesti; spektripisteet ovat keskenään identtisiä eli aika-arvojen paikoissa ja pituuksissa ei ole vaihtelua. Ajoitusvirheiden vuoksi todellinen fotonin osumahetken mittaaminen voi kuitenkin muistuttaa enemmän kuvan 12 b) tilannetta. TDC-piirien epälineaarisuuden myötä jokaisella TDC-piirin aika-arvolla aika-arvon pituus ei vastaakaan tarkasti piirin nimellistä resoluutiota, vaan aika-arvojen pituuksissa on vaihtelua. Myös aika-arvojen paikat vaihtelevat TDC-piirien eli spektripisteiden välillä. Näiden epäideaalisuuksien seurauksena esimerkiksi kuvaan 12 b) mustalla viivalla merkityllä ajanhetkellä havaittava fotoni tuottaa eri spektripisteissä mitattuna kolme eri aika-arvoa.

Edellytyksenä ajoitusvirheistä johtuvien spektrin vääristymien korjaamiselle on, että ajoitusvirheet tunnetaan riittävän tarkasti. Parhaassa tapauksessa tunnettaisiin täsmällisesti koko ajoitusdata eli jokaisen aika-arvon paikka ja pituus jokaisessa spektripisteessä. Toisin sanoen tunnettaisiin tarkasti kaikki kuvan 12 b) mukaiset käyrät.

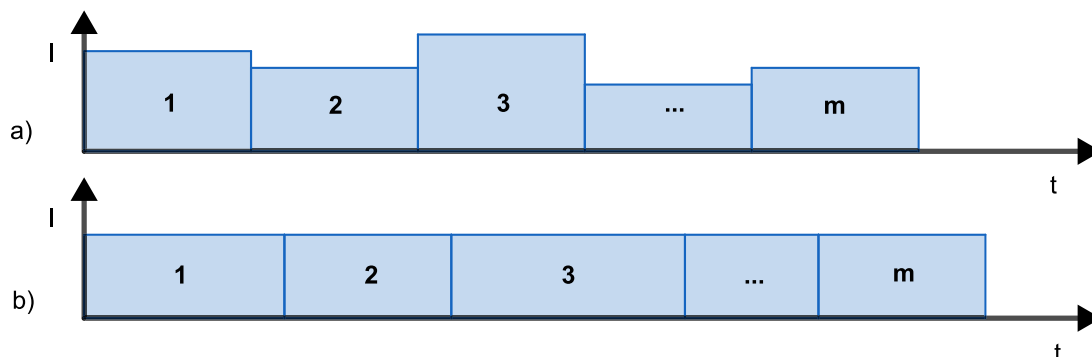
Monikanavaisen sensoripiirin ajoitusvirheitä on määritetty aiemmin erillistä karakterisointilaitteistoa käyttäen [35]. Nyt ajoitusvirheiden määrittämiseen pyritään kehittämään menetelmä, jota voitaisiin käyttää ilman lisälaitteistoa ja ramanspektrometrin ollessa normaalissa toimintatilassa. Menetelmän tavoitteena on siis tehdä erillinen karakterisointilaitteisto tarpeettomaksi ja toisaalta poistaa ajoitusvirheiden määrittämisessä mahdollisesti syntyviä virheitä, joiden syynä on karakterisointilaitteiston ja ramanspektrometrin erilainen rakenne. Ajoitusvirheen määrittämenetelmän eri variaatiot numeroidaan tekstissä merkinnöillä M1-M3 ja kompensointimenetelmät merkinnöillä K1-K3, jotta simulointien ja mittausten yhteydessä voidaan selkeästi viitata käytettyyn menetelmään.



Kuva 12. Fotonin osumahetken mittaaminen a) ilman ajoitusvirhettä ja b) ajoitusvirheen kanssa.

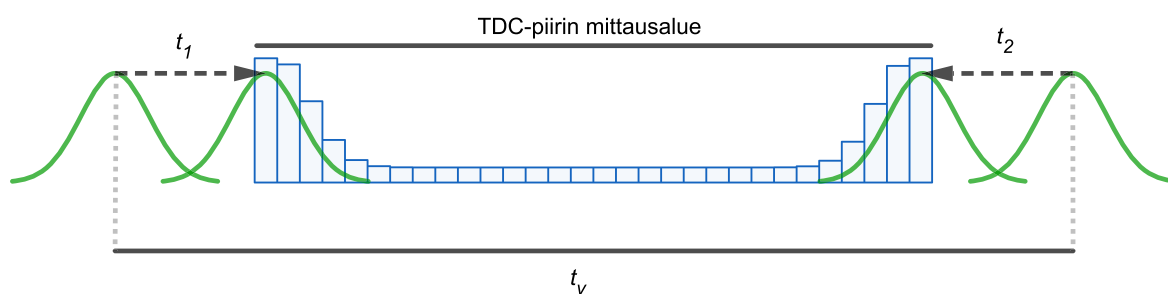
Kehitetty menetelmä (M1) muodostuu kahdesta erilaisesta mittauksesta ja tulosten jälkikäsittelystä. Ensimmäisessä vaiheessa mitataan jokaisessa kanavassa TDC-piirin aika-arvojen pituudet suhteessa toisiinsa. Tämä voidaan tehdä mittaamalla ajan kanssa

korreloimatonta signaalia eli tasaista jatkuva-aikaista valoa tai satunnaisilla ajanhetkillä tapahtuvia sensorin pimeäliipaisuja. Koska näiden signaalien intensiteetti on ajan suhteen vakio, TDC-piirin tuottamien aika-arvojen havaintomäärien suhteet vastaavat aika-arvojen pituuksien suhteita. Mittaustulosta ideaaliseksi ajatellulla aika-asteikolla ja sen avulla määritettyä todellista aika-asteikkoa havainnollistetaan kuvissa 13 a) ja 13 b).



Kuva 13. a) Jatkuvalla valolla havaittavat fotonimäärät eri aika-arvoilla. b) Jatkuvalla valolla havaituista fotonimääristä määritetyt aika-arvojen suhteelliset pituudet.

Toisessa mittausvaiheessa aika-arvojen suhteelliset pituudet on muutettava absoluuttiseen aika-asteikkoon. Toisen mittausvaiheen toteutusta havainnollistetaan kuvassa 14. Tähän käytetään kalibrointinäytettä, jonka fluoresenssin aikavakio on pieni (alle laserpulssin leveyden) ja fluoresenssin emissiospektri riittää kattamaan sensorin spektraalisen leveyden kokonaan. Säädetään ensin TDC-piirin mittausalue alkamaan vasta laserpulssin huipun jälkeen. Tämän jälkeen viivästetään laserpulssia askel kerrallaan, kunnes laserpulssin huippu on jokaisessa spektripisteessä ohittanut TDC-piirin ensimmäisen aika-arvon. Tallennetaan jokaisen askeleen mittaustulokset. Säädetään sitten tunnettua vakioviivettä  $t_v$  (elektroninen tai optinen viive-elementti) käyttäen koko TDC-piirin mittausalue laserpulssin etupuolelle. Vähennetään laserpulssin viivästystä taas askel kerrallaan, kunnes laserpulssin huippu on jokaisessa spektripisteessä ohittanut TDC-piirin viimeisen aika-arvon. Jokaisen askeleen mittaustulokset tallennetaan.



Kuva 14. Ajoitusdatan määrittämenetelmän M1 mittausvaihe 2.

Tulosten jälkikäsitelyssä haetaan ensin toisen vaiheen mittaustuloksista kuvassa 14 esitetyt ajat  $t_1$  ja  $t_2$ , joilla fotonimäärä ensimmäisen ja viimeisen aika-arvon kohdalla on suurimmillaan. Suurimman fotonimäärän antaman ajan suoran valinnan sijaan voidaan tarvittaessa valita joukko suurimpia fotonimääriä antavia aikoja ja käyttää niiden keskiarvoa, tai sovittaa mittaustuloksiin sopiva käyrä ja käyttää käyrän huipun paikkaa. Käytetään aika-arvojen kokonaismäärälle symbolia  $m$  ja ensimmäisessä mittausvaiheessa mitattujen fotonien määrille

merkintää  $n_i$ , missä  $i$  on aika-arvon järjestysnumero. Olettaen, että tietyllä aika-arvolla havaitaan suurin fotonimäärä silloin, kun mitattavan pulssin huippu on aika-arvon keskikohdassa ja että pulssin muoto on symmetrinen, saadaan aikavälillä  $t_v - t_1 - t_2$  ensimmäisessä mittausvaiheessa havaittavien fotonien määräksi  $\frac{n_1}{2} + \sum_{i=2}^{m-1} n_i + \frac{n_m}{2}$ . Näin ollen muuntokertoimeksi  $C_{t/n}$ , jolla ensimmäisen mittausvaiheen fotonimäärät voidaan muuntaa aika-arvojen pituuksiksi, saadaan

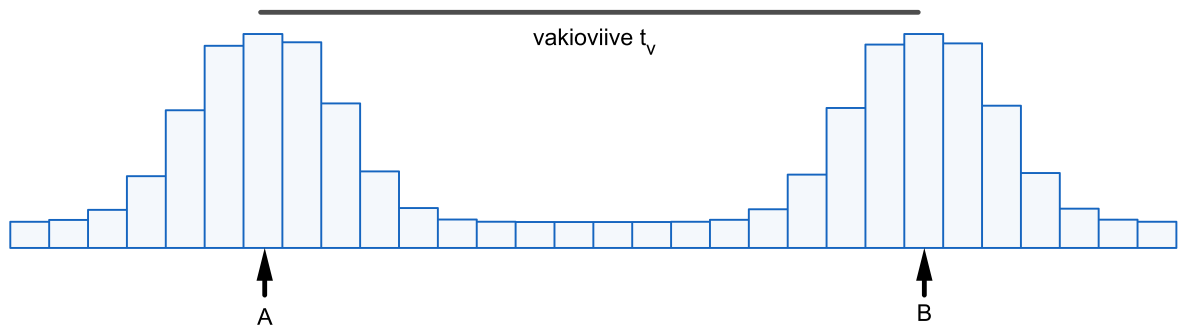
$$C_{t/n} = \frac{t_v - t_1 - t_2}{\frac{n_1}{2} + \sum_{i=2}^{m-1} n_i + \frac{n_m}{2}}. \quad (11)$$

Sensorin ajoitusvirheet sisältävä kuvan 12 b) mukainen ajoitusdata muodostetaan kertomalla kertomella  $C_{t/n}$  kaikki ensimmäisen mittausvaiheen fotonimäärät  $n_i$  jokaisessa spektripisteessä.

Edellä kuvattu menetelmä ajoitusdatan määrittämiseen edellyttää, että laitteistossa on käytössä tarkka ja säädettävä viive-elementti. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää esimerkiksi ilmaeristeistä koaksiaalikaapelia, jonka pituus on säädettävissä [35]. Mikäli käytettävän TDC-piirin mittausalue ja resoluutio ovat riittäviä ja suurinta mahdollista tarkkuutta ei ajoitusdatan määrittämisessä vaadita, voidaan menetelmästä käyttää nopeutettua versiota, jossa säädettävää viive-elementtiä ei tarvita (M2). Menetelmän M2 käyttöä havainnollistetaan kuvassa 15. Menetelmän M2 toisessa mittausvaiheessa käytetään sellaista vakioviivettä, että kalibrointinäytteestä saatava valopulssi mahtuu mittausalueelle viiveen kanssa ja ilman sitä. Vakioviive voidaan toteuttaa esimerkiksi vaihtamalla laitteistosta koaksiaalikaapeli toiseen eri pituiseen kaapeliin. Määritetään pulssin keskikohta korkeimman intensiteetin antaman aika-arvon paikkana ilman vakioviivettä ja sen kanssa. Tällöin muuntokerroin  $C_{t/n}$  saadaan muotoon

$$C_{t/n} = \frac{t_v}{\frac{n_a}{2} + \sum_{i=a+1}^{b-1} n_i + \frac{n_b}{2}}, \quad (12)$$

missä  $a$  on aika-arvo, jossa intensiteetti on suurimmillaan ilman viivettä ja  $b$  aika-arvo, jossa intensiteetti on suurimmillaan vakioviivettä  $t_v$  käytettäessä. Aika-arvojen vertailuun sopiva intensiteettiluku saadaan jakamalla toisen mittausvaiheen fotonimäärät ensimmäisen mittausvaiheen fotonimäärällä aika-arvokohtaisesti. Intensiteettiä käytetään fotonien lukumäärän sijaan tässä menetelmässä poistamaan aika-arvojen pituuksien vaihtelusta syntyvää virhettä. Aika-arvojen pituuksien vaihtelun seurauksena suurin fotonimäärä voidaan havaita muita pidemmän aika-arvon kohdalla, vaikka pulssin huippu ei kyseisen aika-arvon kohdalle osukaan.



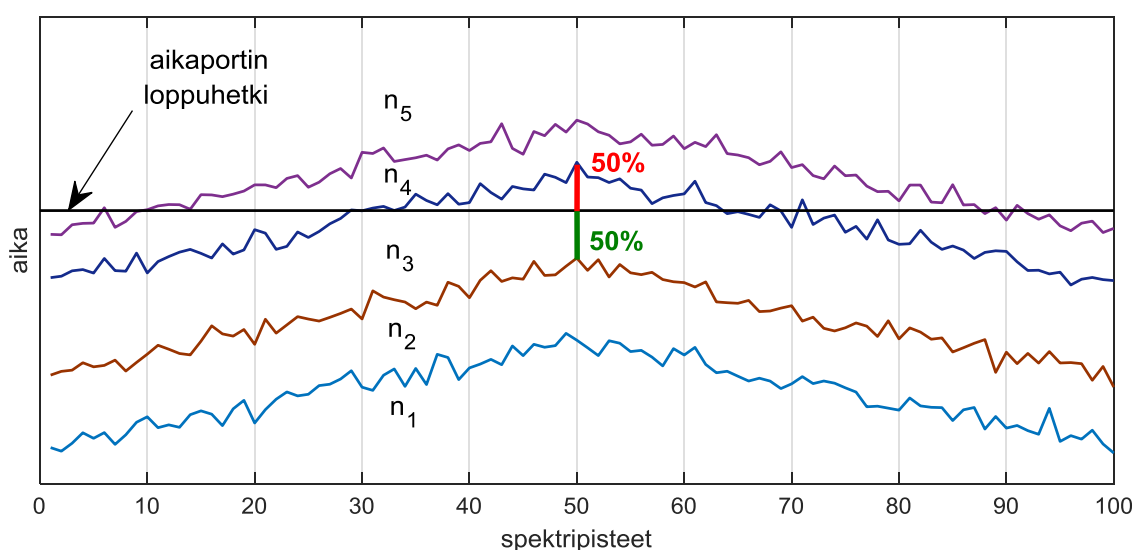
Kuva 15. Ajoitusdatan määrittämenetelmän M2 mittausvaihe 2.

Mikäli ajoitusvirhe muodostuu pääosin TDC-piirin aika-arvojen paikkojen vaihtelusta spektripisteiden välillä (aika-arvojen pituuksien vaihtelu on pientä) ja TDC-piirin resoluutio on riittävä, voidaan ajoitusvirheestä määrittää dominoiva muoto yhdellä mittauksella (M3). Mittauksessa ajoitetaan lyhyen aikavakion fluoresoivasta näytteestä saatava pulssi kohtaan, johon ramanmittauksissa on tarkoitus asettaa aikaportin loppuhetki. Tulosten käsittelyssä tulkitaan valopulssin paikka mittaustulosten histogrammin keskiarvona. Histogrammin keskiarvon vaihtelu spektripisteiden välillä kertoo ajoitusvirheen yleismuodon, esimerkiksi kuvan 12 b) tapauksessa kahdesta lineaarisesta osasta muodostuvan virheen.

## 5.2 Ajoitusvirheiden kompensointi

Ajoitusvirheiden kompensoinnissa pyritään mittaustulosten jälkikäsitteilyllä poistamaan ajoitusvirheiden vaikutus mitatusta spektristä. Aikaportitetun ramanspektroskopian kannalta ajoitusvirheiden kompensoinnilla pyritään pääasiassa poistamaan aikaportin loppuhetkessä olevan spektripisteiden välisen vaihtelun vaikutusta. Kattavasti tehdyn ajoitusdatan määrittämisen (M1 tai M2) perusteella kompensointi voidaan tehdä käyttäen kuvan 16 periaatetta (K1). Ajoitusdatan perusteella määritetään, että mihin TDC-piiriin aika-arvoon halutun aikaportin loppuhetki osuu. Tämän jälkeen lasketaan osuus, joka kyseisen aika-arvon pituudesta on ennen aikaportin loppuhetkeä. Kokonaisfotonimäärää laskettaessa huomioidaan kaikki aikaisemmat aika-arvot kokonaisuudessaan ja aikaportin kohdalla oleva aika-arvo siltä osin, mikä on ennen aikaportin loppuhetkeä. Esimerkiksi kuvassa 16 spektripisteessä 50 huomioitava fotonimäärä  $n_{\text{tot}} = n_1 + n_2 + 0,5n_3$ . Erityisen hyvällä TDC-piiriin resoluutiolla laskentatapaa voidaan yksinkertaistaa jättämällä edellä mainitusta summasta viimeinen termi pois ja huomioida vain ennen aikaportin loppuhetkeä olevat kokonaiset aika-arvot (K2).

Jos ajoitusvirheestä on määritetty vain yleismuoto (M3), ei aikaportin loppuhetkeä voida määritellä aika-asteikolla, koska ei tiedetä mihin TDC-piirien aika-arvoihin loppuhetki osuu. Tällöin aikaportin loppuhetki on aluksi määriteltävä TDC-piirin aika-arvoihin sitoen, käyttäen aikaporttina esimerkiksi viittä ensimmäistä aika-arvoa. Tämän jälkeen jokaisen spektripisteen kohdalla voidaan aikaportin loppuhetkeä säätää lisäten ja vähentäen aika-arvoja tai niiden osia määritetyn yleismuodon perusteella. Koska tarkkoja aika-arvojen pituuksia ei tässä tapauksessa tunneta, kompensoinnissa on käytettävä oletusta aika-arvojen ideaalisesta pituudesta. (K3)



Kuva 16. Ajoitusvirheiden kompensoinnin periaate.

## 6 SIMULOINNIT

Kaikki tässä luvussa esitetyt simuloinnit on tehty MATLAB-ohjelmistoa käyttäen. Kompensointimenetelmien simuloinneissa käytetty MATLAB-koodi on esitetty liitteessä 1.

### 6.1 Menetelmä M1

Menetelmän M1 ensimmäistä mittausvaihetta ei ole mielekästä simuloida. On kuitenkin tarpeen arvioida, että millä havaittujen fotonien määrällä mittaustulosten tilastollinen vaihtelu ei muodosta mittaukseen merkittävää virhelähdettä. Mittauksessa, jossa havaitaan keskimäärin  $N$  fotonia, mittaustulosten keskihajonta on  $\sqrt{N}$ , ja noin 99,7% mittauksista poikkeaa keskiarvosta enintään kolmen keskihajonnan ( $3\sqrt{N}$ ) verran. Näin ollen 99,7% todennäköisyydellä mitattujen fotonien määrä poikkeaa keskiarvosta alle sadasosan, kun

$$\frac{3\sqrt{N}}{N} < 0,01, \quad (13)$$

josta  $N = 90000$ . Nyrkkisääntönä voitaneen pitää, että kun jokaista TDC-piirin aika-arvoa kohti havaitaan vähintään 100000 fotonia, on tilastollisesta hajonnasta johtuva virhe varmasti alle 1% suuruusluokassa.

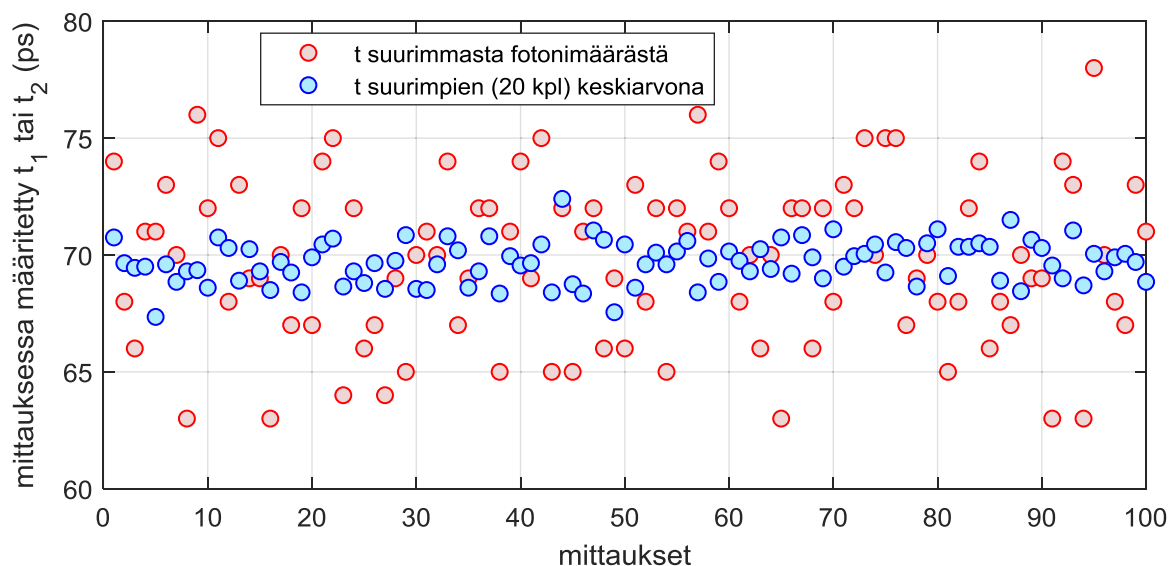
Menetelmän M1 toisen mittausvaiheen tarkkuutta arvioitiin simuloinneilla. Kaikissa simuloinneissa käytettiin seuraavia vakiolukuarvoja: laserpulssin leveys 150 ps (FWHM), SPAD-ilmaisimen jitteri 80 ps (FWHM) ja näytteen fluoresenssin aikavakio 90 ps. Aikavälien  $t_1$  ja  $t_2$  määrittämiseen simuloitiin 200 askelta muuttaen valopulssin paikkaa 1 ps askelin. Simulointien perusteella aika-arvon paikan määrittämisessä on pieni systemaattinen virhe, jonka suuruus riippuu käytettävän aika-arvon leveydestä. Virhe aiheutuu fotonien aikajakauman epäsymmetrisestä muodosta. Epäsymmetrinen muoto taas johtuu siitä, että kalibroitinnäytteen fluoresenssin aikavakio ei ole olemattoman pieni vaan samaa suuruusluokkaa laserpulssin leveyden kanssa. Systemaattisen virheen suuruus oli simuloinneissa 100 ps aika-arvon pituudella 4 ps, 50 ps aika-arvon pituudella 2 ps ja 20 ps aika-arvon pituudella alle 1 ps. Mikäli TDC-piirin aika-arvojen pituuksissa ei ole juurikaan vaihtelua, systemaattinen virhe on likimain yhtä suuri molemmissa aikavälien  $t_1$  ja  $t_2$  määrittämisissä. Tällöin se kumoutuu kaavan (11) osoittajassa pois, ei aiheuta virhettä kertoimeen  $C_{t/n}$ , eikä myöskään tee eroja spektripisteiden välille. Mikäli aika-arvojen pituuksissa on spektripisteiden välillä vaihtelua, myös toisen mittausvaiheen systemaattisessa virheessä on vaihtelua joka jää virheeksi määritettyyn ajoitusdataan.

Tilastollisen vaihtelun menetelmään M1 aiheuttamaa virhettä tarkasteltiin simuloimalla 100 mittauksen (aikavälin  $t_1$  tai  $t_2$  mittaus) sarjassa esiintyvää vaihtelua. Koska tilastollisen vaihtelun vaikutus voidaan pienentää merkityksettömäksi mittausaikoja kasvattamalla, esitetään arvio mittausajoista, joilla tulokset  $t_1$  ja  $t_2$  saadaan selville neljällä eri tarkkuudella. Arviot mittausajoista on esitetty taulukossa 2. Arvioiden perustana on käytetty seuraavia lukuarvoja: mittaustahti 400 ksample/s, fotonin havaitsemisen todennäköisyys yhdessä mittauksessa 5% ja aika-arvon pituus 50 ps. Määritettäessä  $t_1$  ja  $t_2$  yksinkertaisesti aika-arvon korkeimman fotonimäärän antamasta askeleesta mittaus on hyvin herkkä tilastolliselle vaihtelulle; vaihtelun pienentämiseksi  $\pm 2$  ps tasolle vaaditaan viikkojen mittausaikaa. Tämän vuoksi simuloitiin aikojen  $t_1$  ja  $t_2$  määrittäminen vaihtoehtoisesti 20 korkeimman fotonimäärän antavan askeleen keskiarvona. Simulointien perusteella keskiarvon käyttö ei tuo mittaukseen enempää systemaattista virhettä, mutta vähentää tilastollisen vaihtelun merkitystä tiputtaen

mittausaikoja selvästi. Kuvassa 17 on esitetty mittaustulosten vaihtelu käytettäessä noin tunnin mittausaikaa toisessa mittausvaiheessa. Simulointien perusteella menetelmä M1 toimii odotetusti, mutta tarkkoja tuloksia haluttaessa vaatii keskiarvon käyttöä aikavälien  $t_1$  ja  $t_2$  määrittämisessä, jotta mittausaika ei kasva kohtuuttoman suureksi.

Taulukko 2. Menetelmän M1 toisen mittausvaiheen kesto eri tarkkuuksilla

Aika-arvon paikan vaihteluväli sadassa mittauksessa	Menetelmän M1 toisen mittausvaiheen kesto määritettäessä aika-arvon paikka yksittäisestä korkeimman intensiteetin viiveestä	Menetelmän M1 toisen mittausvaiheen kesto määritettäessä aika-arvon paikka keskiarvona korkeimpien (20 kpl) intensiteettien viiveistä
+/- 1 ps	kuukausia	12 h
+/- 2 ps	viikkoja	2 h 30 min
+/- 5 ps	12 h	5 min
+/- 10 ps	30 min	30 s



Kuva 17. Tulosten tilastollinen vaihtelu menetelmän M1 toisessa mittausvaiheessa 1 tunnin mittausajalla.

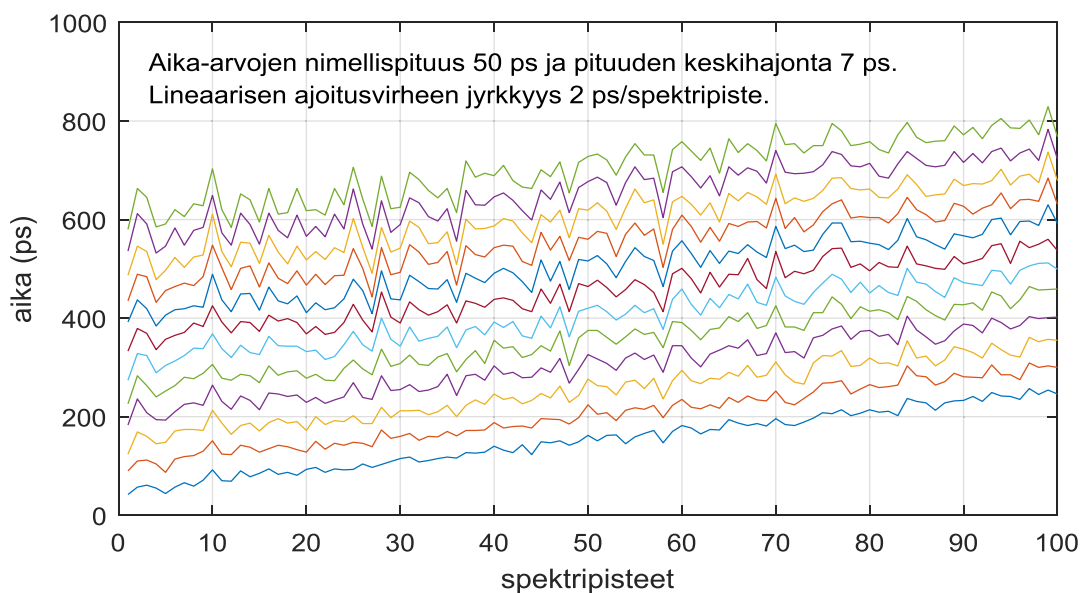
## 6.2 Menetelmä M2

Menetelmässä M2 ensimmäinen mittausvaihe on täsmälleen samanlainen kuin edellisessä luvussa kuvattu menetelmän M1 ensimmäinen mittausvaihe ja toisessa mittausvaiheessa muodostuva virhe voidaan arvioida ilman simulointeja. Menetelmän M2 toisen mittausvaiheen molemmissa mittauksissa valopulssin keskikohdan ajatellaan olevan korkeimman intensiteetin omaavan aika-arvon keskikohdassa. Todellisuudessa pulssin huippu voi olla molemmissa mittauksissa missä tahansa kohdassa kyseistä aika-arvoa. Pahimmassa tapauksessa sekä aikavälin  $t_1$  että  $t_2$  määrittämisessä syntyy virhettä puolen aika-arvon pituuden verran ja tällöin menetelmällä M2 määritetyssä ajoitusdatassa voi olla virhettä enimmillään noin yhden aika-arvon pituuden verran. Menetelmää 2 voidaan käyttää ilman suurta virhettä silloin, kun TDC-

piirin resoluutio on erittäin hyvä. Menetelmän käyttö voi tulla virheestä huolimatta kyseeseen myös siinä tapauksessa, että tarkasti säädettävää viive-elementtiä ei ole käytössä, koska tällöin menetelmää M1 ei voida käyttää.

### 6.3 Menetelmät K1 ja K2

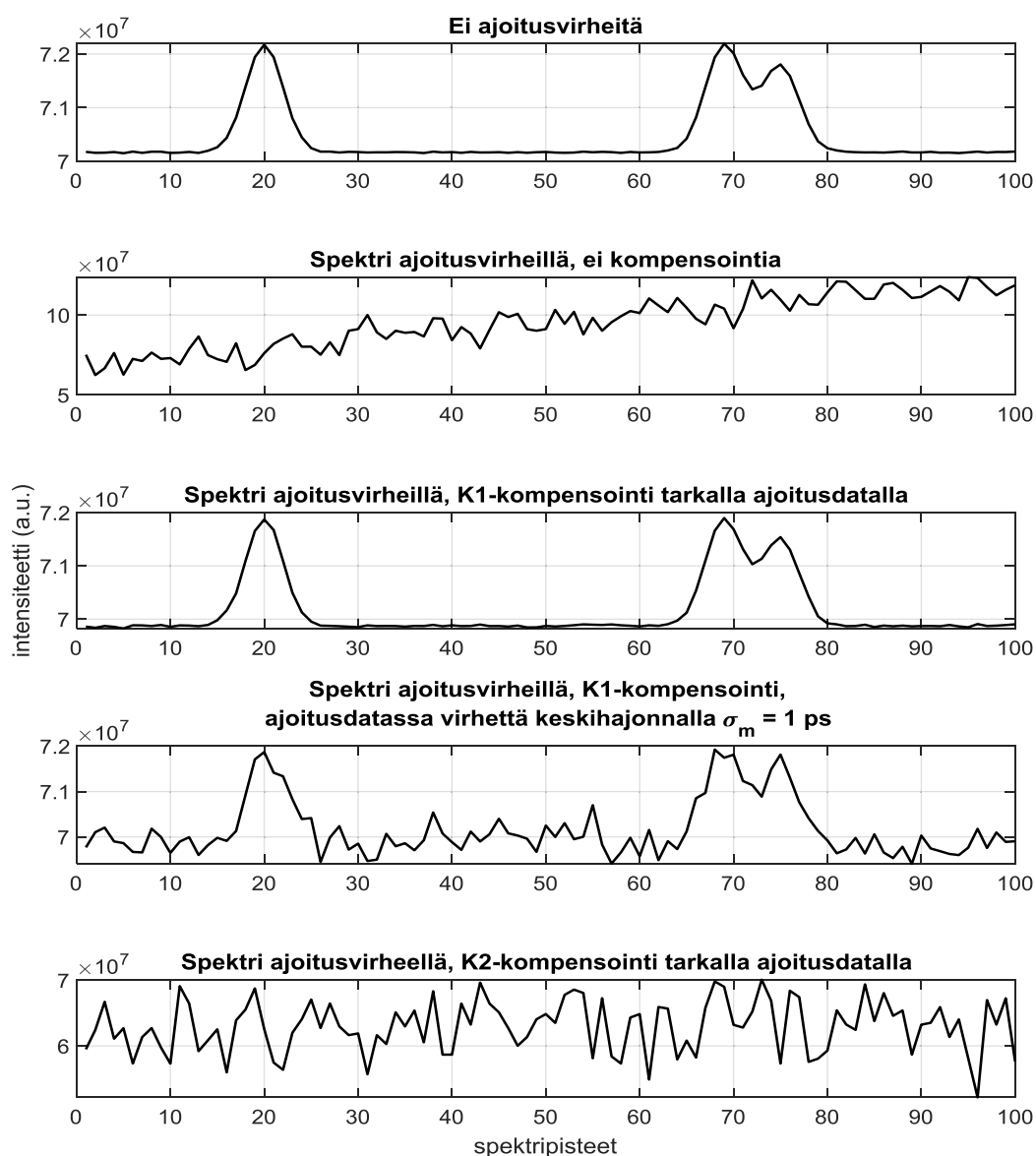
Ajoitusvirheiden kompensoinnin simuloinneissa muodostettiin ensin piirin ajoitusdata, joka mittauksissa olisi voitu tuottaa menetelmällä M1 tai M2. Käytetty ajoitusdata on esitetty kuvassa 18. Aika-arvojen pituuksien keskihajonta on kuvassa 18 samaa suuruusluokkaa kuin tämän työn mittauksissa käytetyllä sensorilla [35]. Kuvan 18 mukaista aikavälinmittausta käyttäen simuloitiin ilman kompensointia ja kompensoinnin kanssa muodostuvat ramanspektrit, kun laserpulssin keskikohta on 300 ps kohdalla ja aikaportin loppuhetki 550 ps kohdalla. Simuloidut ramanspektrit on esitetty kuvassa 19. Ilman kompensointia muodostettuun spektriin on jokaisessa spektripisteessä laskettu kaikki fotonit kymmenen ensimmäisen aika-arvon osalta. Kompensointimenetelmiä K1 ja K2 käyttäen muodostetuissa spektreissä, joissa ajoitusdatan virhettä ei ole mainittu, on ajoitusdata oletettu määritetyn täysin virheettömästi. Kuvan 19 perusteella voidaan todeta, että kompensointimenetelmä K2 on haastavan näytteen tapauksessa 50 ps resoluutiolla käyttökelvoton. Kompensointimenetelmä K1 on kuvan 19 perusteella varsin tehokas, kun käytettävissä on täysin tarkka ajoitustieto, mutta menetelmän teho heikkenee ajoitusdatan epätarkkuuden myötä.



Kuva 18. Kompensointimenetelmien K1 ja K2 simuloinneissa käytetty ajoitusdata.

Kuvan 19 kaltaisia simulointituloksia tarkasteltiin silmämääräisesti eri resoluution,  $R_F/R$ -suhteen ja ajoitusdatan määrittämisessä olevan epätarkkuuden  $\sigma_m$  arvoilla. Tulokset  $R_F/R$ -suhteen arvoista, joilla spektri on luettavissa on koottu taulukkoon 3. Taulukon 3 perusteella aikavälinmittauspiiriin parempi resoluutio auttaa selvästi vaativampia näytteitä mitattaessa, mikäli käytetään kompensointitapaa K2. Kompensointitavan K2 osalta tulokset on esitetty vain tarkalla ajoitusdatan määrittämisellä, koska simulointien perusteella hajonnan  $\sigma_m$  ollessa alle 5 ps, sillä ei ole juurikaan merkitystä menetelmän K2 tarkkuuteen. Myös kompensointitapaa K1 käytettäessä parempi resoluutio auttaa, mutta vain jos ajoitusdatan määrittäminen on tehty erittäin tarkasti. Menetelmän K1 tarkkuus paranee tarkemman resoluution myötä (lyhyemmällä aika-

arvon pituudella fluoresenssin intensiteetti ehtii muuttua yhden aika-arvon aikana vähemmän), mutta tämä ei auta, jos dominoiva virhelähde on epätarkkuus ajoitusdatan määrittämisessä. Taulukon 3 perusteella pienikin epätarkkuus ajoitusdatan määrittämisessä muodostuu helposti dominoivaksi verrattuna menetelmän K1 aiheuttamaan virheeseen. Resoluution ollessa 200 ps menetelmän K1 oma epätarkkuus alkaa jo selvästi näkyä eikä ajoitusdatan täydellisen tarkasta määrittämisestä ole enää tällä resoluutiolla hyötyä. Lyhyemmällä fluoresenssin aikavakiolla  $\tau_F = 1$  ns tehdyistä simuloinneista huomataan, että parempi resoluutio auttaa, mikäli on tarpeen mitata hyvin suuren  $R_F/R$ -suhteen sekä pienen aikavakion näytteitä ja ajoitusdatan määrittäminen on mahdollista tehdä tarkasti.



Kuva 19. K1- ja K2-kompensoitu ramanspektri. TDC-piirin resoluutio on 50 ps ja aika-arvojen pituuksien keskihajonta 7 ps. Näytteen  $R_F/R$ -suhde on 300 ja  $\tau_F = 2$  ns.



Taulukko 3. Mitattavissa olevien näytteiden  $R_F/R$ -suhteet menetelmillä K1 ja K2

Kompensointi-tapa	$R_F/R$ -suhde, jolla spektriipikit ovat silmämääräisesti arvioiden luettavissa. Fluoresenssin aikavakio $\tau_F = 2$ ns.				
	resol. 200 ps, $\sigma_w = 20$ ps	resol. 100 ps, $\sigma_w = 10$ ps	resol. 50 ps, $\sigma_w = 5$ ps	resol. 25 ps, $\sigma_w = 2,5$ ps	resol. 10 ps, $\sigma_w = 1$ ps
K2, $\sigma_m = 0$ ps	n. 10**	n. 15**	n. 30	n. 50	n. 150
K1, $\sigma_m = 4$ ps	n. 100	n. 100 (60*)	n. 100	n. 100	***
K1, $\sigma_m = 3$ ps	n. 150	n. 150 (100*)	n. 150	n. 150	***
K1, $\sigma_m = 2$ ps	n. 200	n. 250 (150*)	n. 250	n. 250 (150*)	n. 180
K1, $\sigma_m = 1$ ps	n. 400	n. 500 (250*)	n. 500	n. 500 (300*)	n. 500
K1, $\sigma_m = 0$ ps	n. 400	n. 1500 (600*)	n. 3000	n. 4000 (3500*)	n. 5000

Taulukossa 3  $\sigma_m$  on ajoitusdatan määrittämisessä tapahtuvan virheen keskihajonta ja  $\sigma_w$  aika-arvon pituuden keskihajonta.

\* fluoresenssin aikavakiolla  $\tau_F = 1$  ns

\*\* spektri luettavissa myös ilman kompensointia

\*\*\* ajoitusdatan määrittämisessä tapahtuva virhe on niin suuri suhteessa resoluutioon, että osa aika-arvojen pituuksista saa negatiivisen arvon eikä spektriä voida muodostaa simuloinnissa

#### 6.4 Menetelmät M3 ja K3

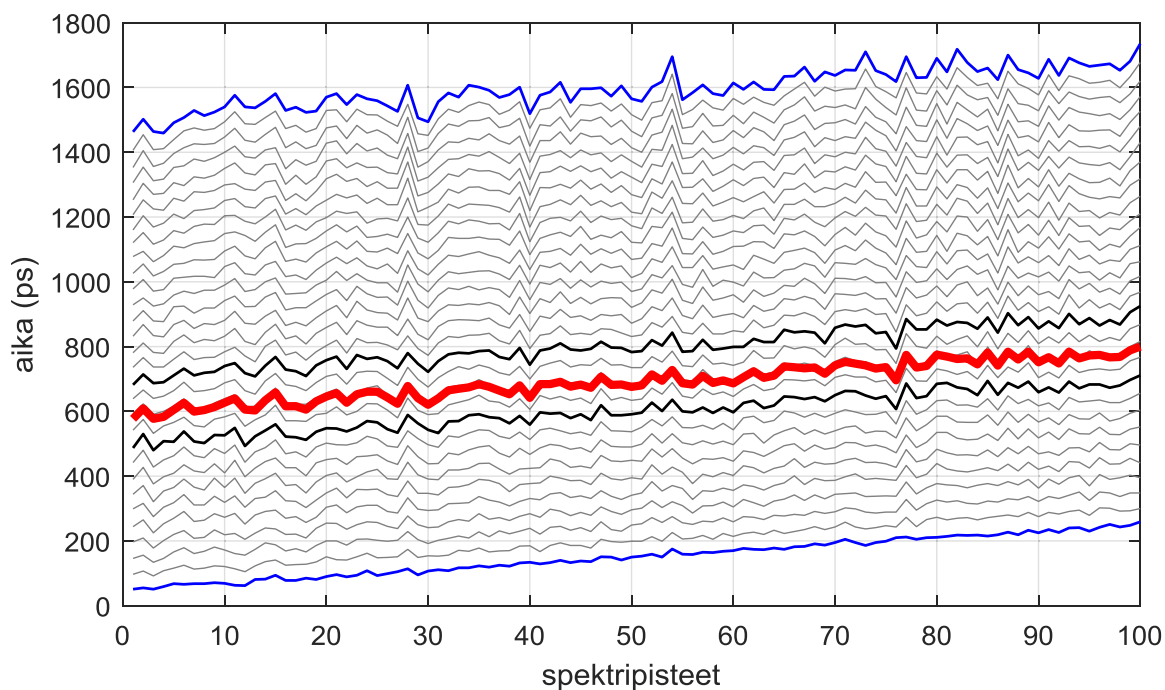
Menetelmien M3 ja K3 on yhdessä tarkoitus muodostaa nopea, yhteen kalibroitimittaukseen perustuva keino ajoitusvirheen yleismuodon määrittämiseen ja karkeaan kompensointiin. Menetelmiä myös testattiin yhdessä simuloimalla menetelmällä M3 kalibroitinäytteen mittauksesta tuotettu ajoitusvirheen yleismuoto ja käyttäen tätä muotoa kompensointimenetelmään K3. Kaikissa simuloinneissa käytettiin kalibroitinäytteelle fluoresenssin aikavakiota  $\tau_F = 90$  ps ja mitattavalle näytteelle fluoresenssin aikavakiota  $\tau_F = 2$  ns. Simuloinneissa havaittiin menetelmien M3 ja K3 toimivuuden riippuvan seuraavien kolmen ehdon toteutumisesta.

1. Kalibroitinäytteestä syntyvän aikajakauman on mahduttava mittausalueelle kokonaan. Kalibroitivaiheessa aikaväli laserpulssin keskikohdasta mittausalueen loppuun on oltava vähintään viisi kalibroitinäytteen fluoresenssin aikavakiota, jotta menetelmässä M3 laskettavaan histogrammin keskiarvoon ei synny lyhyestä mittausalueesta johtuvaa virhettä. Tätä lyhyemmällä mittausalueella fluoresenssin häntä jää mittausalueen ulkopuolelle aiheuttaen virhettä keskiarvon laskentaan.
2. TDC-piirin aika-arvojen pituuksien poikkeama nimellisarvosta on oltava pientä. Koska aika-arvojen pituuksia ei tunneta menetelmissä M3 ja K3, on laskuissa käytettävä aika-arvon pituuksille nimellisarvoa. Mitä enemmän aika-arvojen pituudet poikkeavat nimellisarvostaan, sitä enemmän virhettä syntyy nimellisarvojen käytöstä.
3. Mikäli aika-arvojen pituuksissa on vaihtelua, käytettävän aikaportin loppuhetken on oltava lähellä kalibroitimittauksessa käytettyä laserpulssin keskikohtaa.

Menetelmällä M3 määritetty ajoitusvirheen yleismuoto noin 700 ps kohdalla on esitetty punaisella käyrällä kuvassa 20. Kalibroitimittauksessa laserpulssin keskikohdan jälkeen on

mittausaluetta ollut jäljellä vielä noin 800 ps, joten edellä mainittu ehto 1 toteutuu hyvin. Ehto 2 ei toteudu, sillä aika-arvojen pituuksissa on vaihtelua. Kuvassa 20 aika-arvojen pituuksien vaihtelu näkyy sinisissä käyrissä eli siinä, että ajoitusvirheen yleismuoto muuttuu TDC-piirin mittausalueen alun ja lopun välillä. Aika-arvojen pituuksien vaihtelun seurauksena ehdon 3 mukaisesti määritetty yleismuoto pätee hyvin vain, kun aikaportin loppuhetki on 700 ps ympäristössä. Tämä näkyy kuvassa 20 siten, että mustalla merkityt käyrät (noin 100 ps päässä yleismuodon määrittyskohdasta) vastaavat hyvin määritettyä yleismuotoa, mutta siniset käyrät poikkeavat tästä muodosta selvästi.

Simuloinneissa tarkasteltiin menetelmiä M3 ja K3 käyttäen tuotettujen ramanspektrien luettavuutta. Aika-arvojen pituuksien vaihtelun sekä aikaportin loppuhetken ja kalibrointimittauksen laserpulssin ajallisen poikkeaman vaikutus luettavissa olevan näytteen  $R_{F/R}$  -suhteeseen on esitetty taulukossa 4. Simuloinneissa TDC-piirin mittausalueen laajuus on valittu siten, että missään taulukon 4 simuloinneissa mittausalueen pituus ei muodosta merkittävää virhelähdettä. Taulukon 4 tulosten perusteella menetelmien M3 ja K3 käyttökelpoisuus riippuu ratkaisevasti aika-arvojen pituuksissa olevan vaihtelun määrästä. Mikäli mittausalueen pituus ei rajoita menetelmän tarkkuutta ja vaihtelu aika-arvojen pituuksissa on pientä, monille näytteille voidaan tuottaa luettava spektri menetelmällä K3.



Kuva 20. Menetelmällä M3 määritetty ajoitusvirheen yleismuoto.

Taulukko 4. Luettavissa olevien näytteiden  $R_{F/R}$  -suhteet menetelmillä M3 ja K3

Aika-arvojen nimellispituus 50 ps, aika-arvojen pituuksien keskihajonta $\sigma_w$	$R_{F/R}$ -suhte, jolla spektriipiikit ovat silmämääräisesti arvioiden luettavissa.	
	Aikaportin loppuhetki kalibroitimittauksen laserpulssin keskikohdassa	Aikaportin loppuhetkessä ja kalibroitimittauksen laserpulssin keskikohdassa poikkeamaa 300 ps
1	n. 400	n. 300
2	n. 250	n. 200
3	n. 130	n. 100
5	n. 80	n. 60
10	n. 40	n. 40

### 6.5 Laserpulssin leveys ja SPAD-ilmaisimen jitteri

Kaikki lukujen 6.1-6.4 simuloinnit tehtiin käyttäen laserpulssin leveydelle arvoa 150 ps (FWHM) ja SPAD-ilmaisimen jitterille arvoa 80 ps (FWHM). Nämä lukuarvot vastaavat likimain luvun 7 mittauksiin käytetyn laitteiston arvoja, jotka ovat laserpulssin leveydelle 150 ps (FWHM) ja SPAD-ilmaisimen jitterille 100 ps (FWHM) [29]. Kehitettäessä laitteistoa yhä tehokkaampaan fluoresenssin vähentämiseen olisi sekä laserpulssin leveyttä että SPAD-ilmaisimen jitteriä hyvä pienentää entisestään. Tehotasoltaan aikaportitettuun ramanspektroskopiaan soveltuva pulssitettu laser, jossa pulssin leveys on 40-70 ps (FWHM) on saatu jo kehitettyä [36]. Lisäksi 150 nm CMOS-teknologialla valmistettujen SPAD-ilmaisimien jitteriksi on mitattu noin 50 ps (FWHM) [37]. On siis realistista arvioida, että sekä laserpulssin leveys ja SPAD-ilmaisimen jitteri voidaan puolittaa laitteiston seuraavaan kehitysversioon siirryttäessä.

Laserpulssin kapeneminen ja SPAD-ilmaisimen jitterin pieneneminen aiheuttavat fluoresoivasta kalibroitinäytteestä ( $\tau_F = 90$  ps) havaittavan fotonien aikajakautuman muuttumisen epäsymmetrisemmäksi. Tämä lisää luvussa 6.1 käsiteltyä menetelmään M1 liittyvien aikojen  $t_1$  ja  $t_2$  määrittämisessä syntyvää systemaattista virhettä. Laserpulssin leveyden ollessa 70 ps (FWHM) ja SPAD-ilmaisimen jitterin ollessa 50 ps (FWHM) simulointien perusteella aikoihin  $t_1$  ja  $t_2$  muodostuu systemaattista virhettä 50 ps aika-arvon pituudella noin 2 ps mutta 100 ps aika-arvon pituudella jo noin 7 ps. Näin ollen laserpulssin leveyden ja SPAD-ilmaisimen jitterin pienentyessä myös TDC-piirin aika-arvojen pituuksien vaihtelua tulisi saada pienemmäksi, jotta menetelmän M1 systemaattinen virhe ei suurenisi.

Laserpulssin kaventuessa ja SPAD-ilmaisimen jitterin pienentyessä menetelmän M1 toisessa mittausvaiheessa tarvitaan vähemmän askelia aika-arvon keskikohdan löytämiseksi eli tässä suhteessa menetelmä M1 hyötyy laitteiston kehittymisestä. Edellä mainittua aikajakauman muuttumista epäsymmetrisemmäksi voisi estää uutta, entistä pienemmän fluoresenssin aikavakion omaavaa kalibroitinäytettä käyttämällä. Mikäli kalibroitinäytteen fluoresenssin aikavakiota saataisiin pienennettyä samassa suhteessa kuin laserpulssin leveyttä ja SPAD-ilmaisimen jitteriä, menetelmän M1 kannalta laitteiston kehityksestä olisi pelkästään etua.

## 7 MITTAUKSET

Kaikki tässä luvussa esitetyt mittaukset on tehty CMOS SPAD-ilmaisimilla toteutettua 256-kanavaista sensoria käyttäen. Sensorin jokaisessa kanavassa on 16 rinnakkaista SPAD-ilmaisinta ja 3-bittinen TDC-piiri fotonien osumahetken mittaamiseen. Käytetyn laitteiston perusrakenne vastaa kuvassa 5 esitettyä rakennetta. Sensori ja laitteisto on esitelty yksityiskohtaisesti lähteessä [29]. Mittaustulosten käsittelyssä käytetyt MATLAB-koodit on esitetty liitteissä 2-4.

TDC-piirin nimellisresoluutiona oli mittauksissa joko 200 ps (referenssikellon taajuus 25MHz), 100 ps (50 MHz) tai 71 ps (70 MHz). Kaikissa kalibrointimittauksissa kalibrointinäytteenä käytettiin erytrosiini B -väriaineen ( $C_{20}H_{64}I_4Na_2O_5$ , Sigma-Aldrich: 198269) vesiliuosta, jossa fluoresenssin aikavakio on noin 90 ps [38]. Menetelmien M2 ja K2 mielekäs käyttö edellyttää, että TDC-piirin resoluutio on noin 10 ps suuruusluokkaa tai parempi. Mittauksissa käytetyllä sensorilla edellä mainittua resoluutiota ei voida saavuttaa, joten menetelmiä M2 ja K2 ei testattu mittauksissa.

### 7.1 Menetelmä M1

Sensorin ajoitusdatan määrittäminen menetelmällä M1 tehtiin erikseen kolmelle eri TDC-piirin resoluutiolle. Ensimmäisessä mittausvaiheessa TDC-piirien aika-arvojen suhteelliset pituudet määritettiin käyttäen jatkuvana valonlähteenä pientä hehkulamppua. Aika-arvojen keskimääräiset osuudet koko TDC-piirin mittausalueesta on esitetty eri resoluutioilla taulukossa 5 (sarake, jossa merkintä %).

Toisessa mittausvaiheessa tehtävään ajoitussignaalien tarkkaan säätöön käytettiin säädettävää ilmaeristeistä koaksiaaliputkea (874-LAL), jossa muodostuva viive riippuu putken pituudesta kertoimella 3,337 ps/mm [39]. Putken pituutta muutettiin aikoja  $t_1$  ja  $t_2$  määrittäessä yhden millimetrin askelin eli laserpulssin paikkaa suhteessa TDC-piirin mittauseräeseen muutettiin noin 3,3 ps askelin. Myös vakioviive  $t_v$  muodostettiin koaksiaaliputkea säätämällä TDC-piirin resoluution arvoilla 100 ps ja 71 ps, 200 ps resoluutiota käytettäessä vakioviive muodostettiin vaihtamalla laitteistosta yksi koaksiaalikaapeli lyhyempään kaapeliin mittausten välillä. Kaapelien pituuserosta muodostuva viive-ero määritettiin erikseen pulssigeneraattorilla ja oskilloskoopilla. Aikojen  $t_1$ ,  $t_2$  ja  $t_v$  merkitys on esitetty aiemmin kuvassa 14. Käytössä olevan sensorin TDC-piirien aika-arvoista 1-6 käytettiin menetelmän M1 toisen mittausvaiheen mittauksissa aika-arvoja 2 ja 5 (resoluutiot 71 ps ja 100 ps) sekä aika-arvoja 1 ja 4 (resoluutio 200 ps), koska käytettyjen koaksiaalikaapeleiden ja koaksiaaliputken tuottama säätöalue ei riittänyt aika-arvojen 1 ja 6 käyttöön. Suurimman fotonimäärän käytetyille aika-arvoille tuottamat ajat  $t_1$  ja  $t_2$  määritettiin mittaustuloksiin sovitettuna 4. tai 5. asteen polynomien huipusta, koska polynomien sovitusta käyttäen menetelmän M1 herkkyyttä laserin tehon vaihtelulle ja raekohinalle saatiin vähennettyä. Toisen mittausvaiheen mittaustulokset ja niihin sovitettua 5. asteen polynomit on esitetty kuudessa eri spektripisteessä 100 ps resoluutiolla kuvassa 21.

Kuvista 21 a) ja c) nähdään, että aika-arvon 2 paikassa on suurta spektripisteiden välistä vaihtelua, spektripisteiden 51 ja 251 välillä jopa noin 100 ps. Kuvista 21 b) ja d) havaitaan, että myös aika-arvon 5 paikassa on spektripisteiden välistä vaihtelua, mutta se on pienempää aika-arvoon 2 verrattuna. Kuvista 21 a) ja c) on nähtävissä polynomien sovituksen merkitys. Kuvassa 21 a) spektripisteessä 101 mittaustulosten yksittäinen huippuarvo havaitaan kohdassa 207 ps, vaikka käyrän huipun keskikohta näyttää silmämääräisesti osuvan alle 200 ps kohdalle. Kuvassa 21 c) samoihin tuloksiin sovitettuna polynomien huippu on kohdassa 190 ps. Polynomien

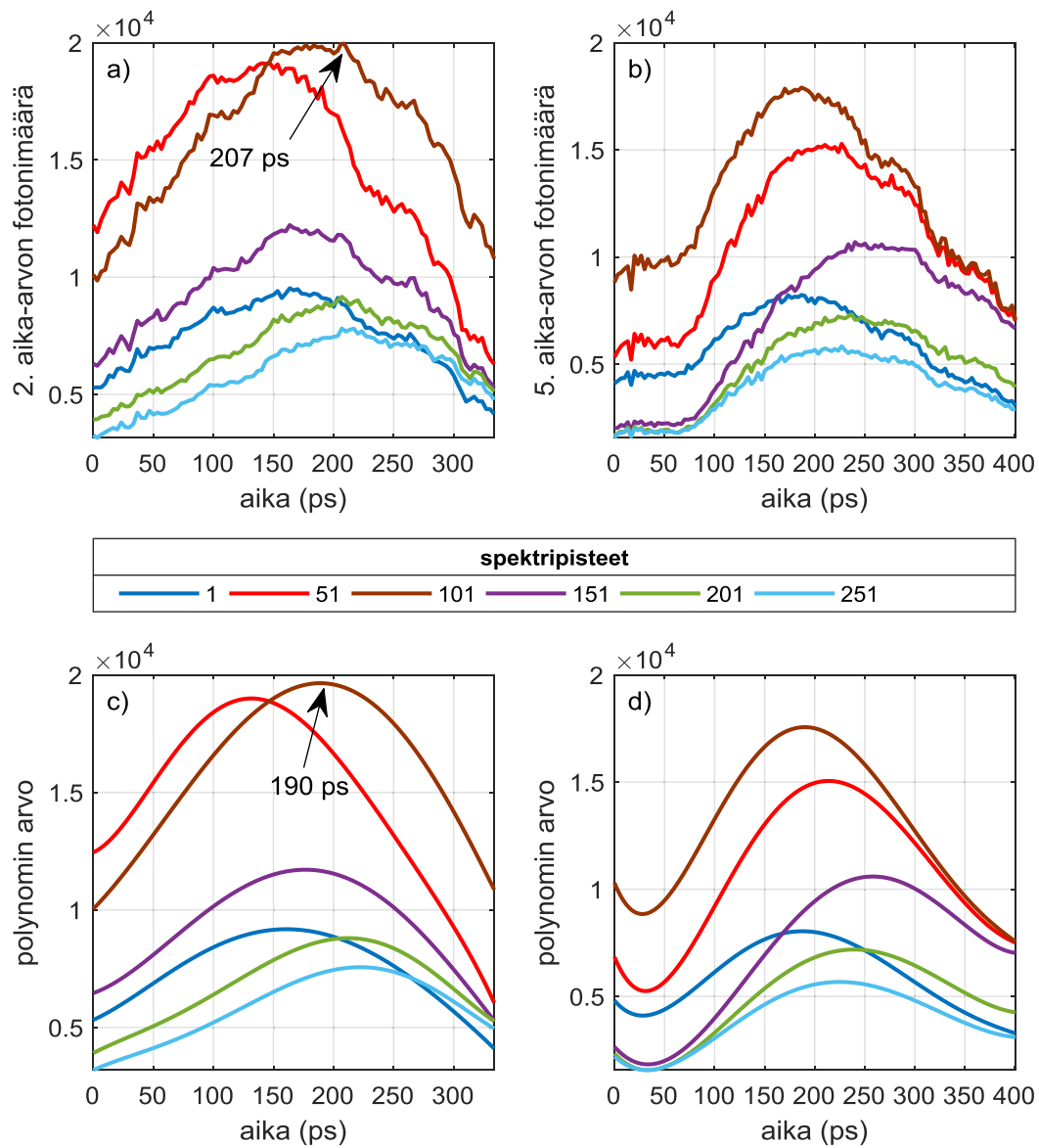
sovituksen myötä siis mittaustuloksissa olevan yksittäisen piikin vaikutus lopputulokseen vähenee olennaisesti.

Taulukko 5. TDC-piirien aika-arvojen keskimääräiset pituudet ja pituuksien vaihtelu

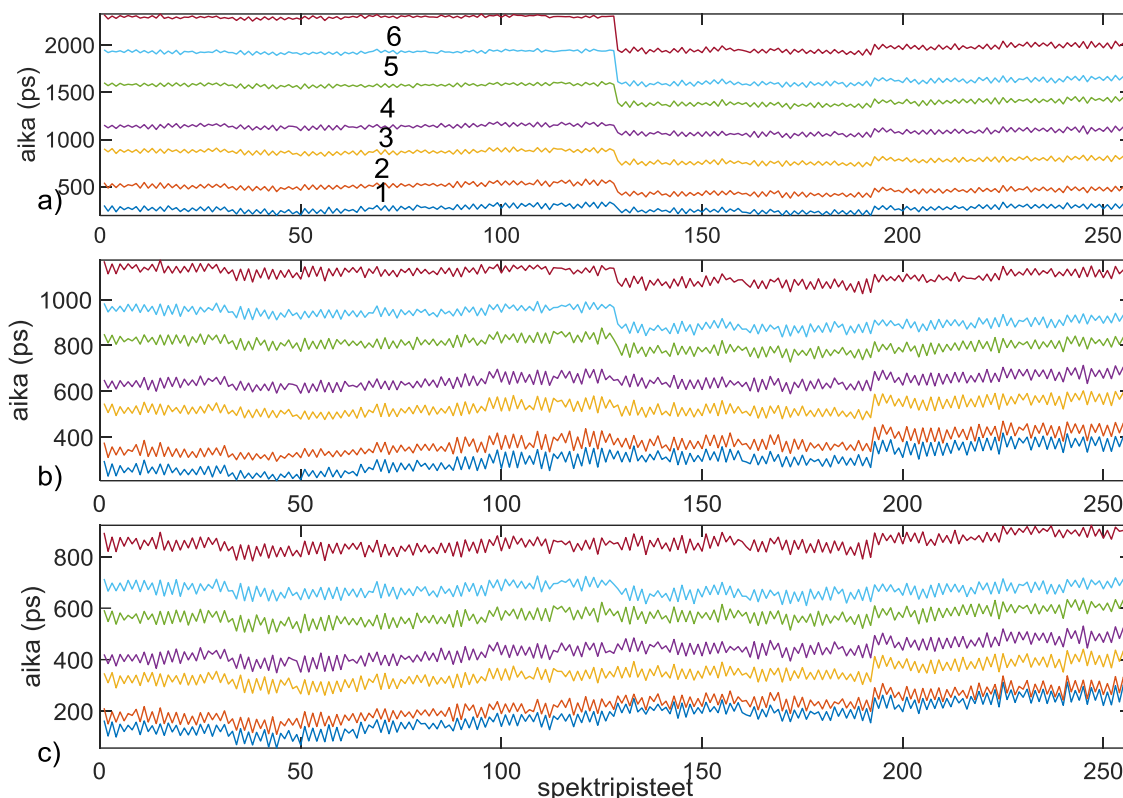
aika-arvo	resoluutio 71 ps			resoluutio 100 ps			resoluutio 200 ps		
	ka (ps)	%	$\sigma$ (ps)	ka (ps)	%	$\sigma$ (ps)	ka (ps)	%	$\sigma$ (ps)
1	42	6	11	71	9	13	214	11	31
2	122	18	18	155	19	20	343	18	20
3	91	14	10	116	14	10	287	16	20
4	135	20	18	160	20	24	375	20	61
5	101	15	17	116	14	18	287	15	65
6	181	27	21	188	24	17	361	20	14

Lopullinen ajoitusdata muodostettiin 1. mittausvaiheen mittaustuloksista kaavalla (11) laskettuja muuntokertoimia käyttäen. Tuloksena saatujen aika-arvojen pituuksien keskiarvot ja keskihajonnat eri resoluutiolla on esitetty taulukossa 5. Menetelmällä M1 muodostettu sensorin ajoitusdata eri resoluutioilla on graafisesti esitetty kuvassa 22. Kuvasta 22 havaitaan sensorin ajoitusvirheen muodostuvan melko säännöllisestä sahalaitamaisesta kuviosta sekä isommista hyppyistä, jotka osuvat spektraalisen alueen keskikohtaan ja jälkimmäisen puoliskon keskikohtaan. Kuvassa 22 a) sahalaitakuvio näyttää pienemmältä kuin kuvissa 22 b) ja 22 c), mutta tämä johtuu laajemmasta skaalasta aika-akselilla eikä todellisesta erosta sahalaitakuvion laajuudessa. Sahalaitakuvio on havaittu samanlaisessa sensorissa myös aiemmin eri menetelmällä tehdyissä ajoitusdatan määrittelyissä [29, 35].

Kuvassa 22 esitetyn ajoitusdatan tarkkuutta on vaikea arvioida sellaisenaan, sillä merkittävästi tarkempaa menetelmää vertailukohdan tuottamiseksi ei ole käytössä. Menetelmän M1 simuloinneissa ei huomioitu lainkaan laserin tehotason vaihtelun vaikutusta menetelmän tarkkuuteen, mutta käytännössä tämä osoittautui merkittäväksi tekijäksi. Mittauksissa käytetty laser on huollon tarpeessa eikä tehotason vaihtelu pysy tällä hetkellä laitevalmistajan lupaamissa rajoissa. Useita tehtyjä mittauksia jouduttiin hylkäämään täysin laserin tehotason vaihtelusta johtuvan epätarkkuuden vuoksi. Laserin tehotason vaihtelun takia raekohinan kannalta riittävän pitkiä mittausaikoja ei voitu käyttää ja mittaustulosten sijaan jouduttiin tarkastelemaan tuloksiin sovitettujen polynomien arvoja. Sovitettujen polynomien arvoja tarkastelemalla laserin tehotason vaihtelun ja raekohinan vaikutusta saatiin vähennettyä, mutta toisaalta polynomin sovitus tuo tulosten käsittelyyn mukaan uuden virhelähteen, jonka merkittävyyttä on vaikea arvioida. Ajoitusdatan tarkkuutta voidaan välillisesti arvioida menetelmän K1 tulosten perusteella. Polynomien sovitukseen liittyvää epävarmuutta kuvaa se, että 100 ps resoluutiolla menetelmä K1 toimi merkittävästi paremmin, kun ajoitusdatan muodostamisessa oli käytetty 5. asteen polynomien sovitusta, kun taas 71 ps resoluutiolla menetelmä K1 toimi selvästi paremmin, mikäli ajoitusdata oli muodostettu käyttäen 4. asteen polynomien sovitusta.



Kuva 21. a) Mittaustulokset menetelmän M1 2. mittaussvaiheessa 2. aika-arvon paikan määrittämisessä (resoluutio 100 ps), b) Mittaustulokset menetelmän M1 2. mittaussvaiheessa 5. aika-arvon paikan määrittämisessä (resoluutio 100 ps), c) 5. asteen polynomit sovitettuna kohdan a) mittaustuloksiin, d) 5. asteen polynomit sovitettuna kohdan b) mittaustuloksiin.



Kuva 22. Sensorin ajoitusdata a) 200 ps, b) 100 ps ja c) 71 ps resoluutiolla.

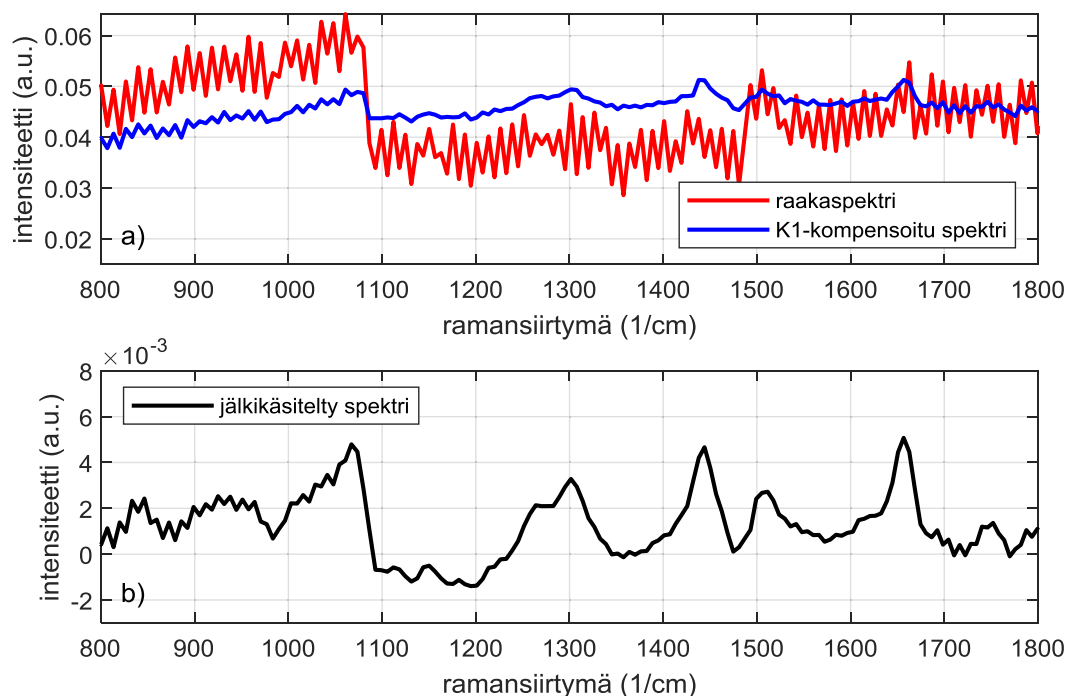
## 7.2 Menetelmä K1

Kompensointimenetelmän K1 testausta varten mitattiin monia fluoresenssitasoiltaan hyvin erilaisia näytteitä. Hyvin pienillä fluoresenssitasoilla menetelmän käytölle ei ole tarvetta ja suurimmilla mitatuilla fluoresenssitasoilla ramanpektriä ei löytynyt kompensointia käyttämälläkään. Mittausten perusteella suurin hyöty kompensoinnista on näytteelle, jolla spektrin ramanpiikkien ja ajoitusvirheen aiheuttamien piikkien suuruus on samaa suuruusluokkaa. Mittauksissa käytetyn sensorin tapauksessa tällaiseksi näytteeksi sopii tuore seesamiöljy. Kuvissa 23-25 on esitetty seesamiöljyn raakaspektri, menetelmällä K1 kompensoitu spektri sekä jälkikäsitelty spektri. Jälkikäsitely sisältää K1-kompensoinnin, perustason korjauksen, liukuvalla keskiarvolla tehdyn suodatuksen ja skaalaamisen suuremmaksi.

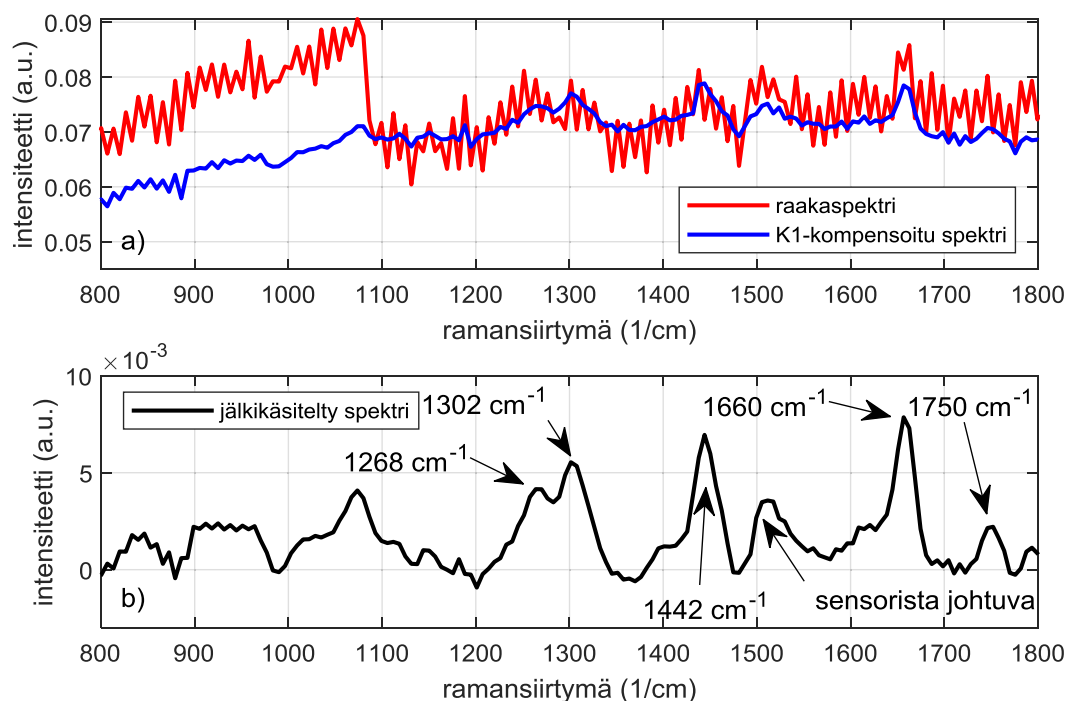
Ruokaöljyjen ramanpektrien tärkeimmät piikit ovat ramansiirtymän arvoilla  $1268\text{ cm}^{-1}$ ,  $1302\text{ cm}^{-1}$ ,  $1442\text{ cm}^{-1}$ ,  $1660\text{ cm}^{-1}$  ja  $1750\text{ cm}^{-1}$  [40]. Kaikki nämä piikit on merkitty kuvan 24 spektriin. Mitattujen spektrien alkuosista on jätetty pois noin ensimmäinen neljäsos, jossa seesamiöljyn ramanpiikkejä ei ole. Kuvista 23-25 havaitaan, että seesamiöljyn ramanpektrin yksittäiset piikit ramansiirtymillä  $1442\text{ cm}^{-1}$ ,  $1660\text{ cm}^{-1}$  ja  $1750\text{ cm}^{-1}$  erottuvat kaikilla resoluutioilla hyvin. Tuplapiikki kohdassa  $1268\text{ cm}^{-1} - 1302\text{ cm}^{-1}$  erottuu 100 ps ja 71 ps resoluutioilla hyvin ja 200 ps resoluutiolla kohtalaisesti.

Kokonaisuudessaan ajoitusvirheestä spektriin muodostuva sahalaitakuvio vähenee kaikkialla vähintään 70% ja monin paikoin selvästi enemmän. Tämä tekee spektrin pääosin hyvin luettavaksi. Ajoitusvirheen isommat hypyt sensorin spektraalisen alueen puolivälissä ja kolmen neljäsosan kohdalla osuvat kuvissa 23-25 ramansiirtymän kohtiin  $1080\text{ cm}^{-1}$  ja  $1480\text{ cm}^{-1}$ .

$\text{cm}^{-1}$ . Näissä kohdissa kompensointi K1 ei toimi hyvin, vaan spektriin jää muotoja, joiden alkuperästä ei voi olla varma. Ongelma on suurin 200 ps resoluutiolla.

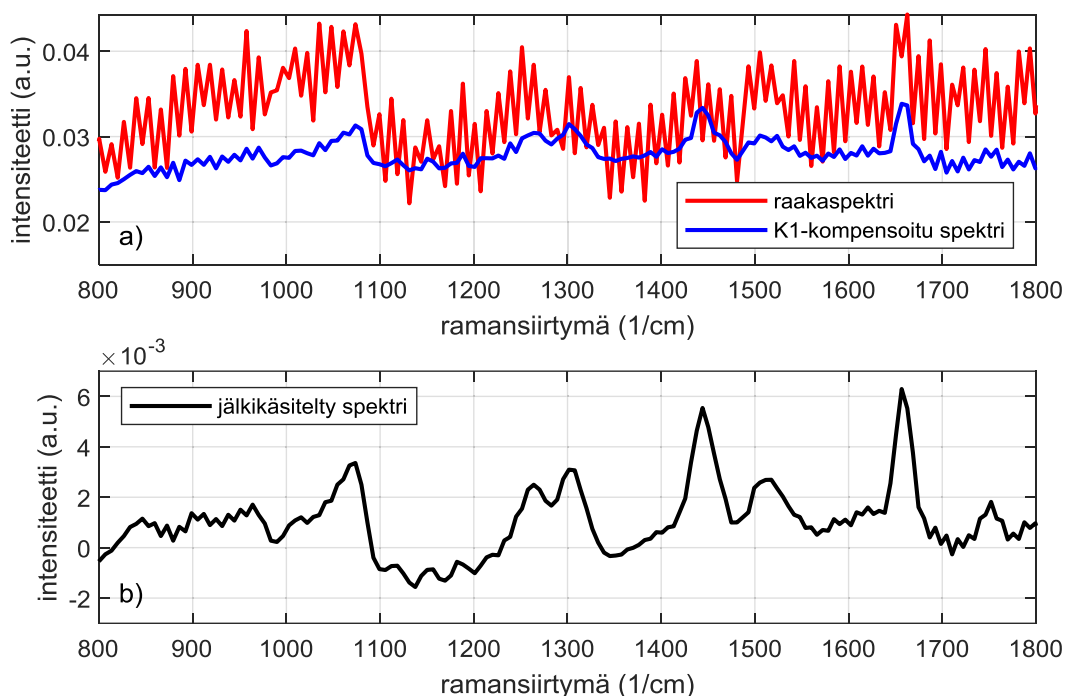


Kuva 23. 200 ps resoluutiolla mitattu tuoreen seesamiöljyn ramanspektri a) ilman kompensointia ja K1-kompensoinnin kanssa, b) jälkikäsittelyn jälkeen.



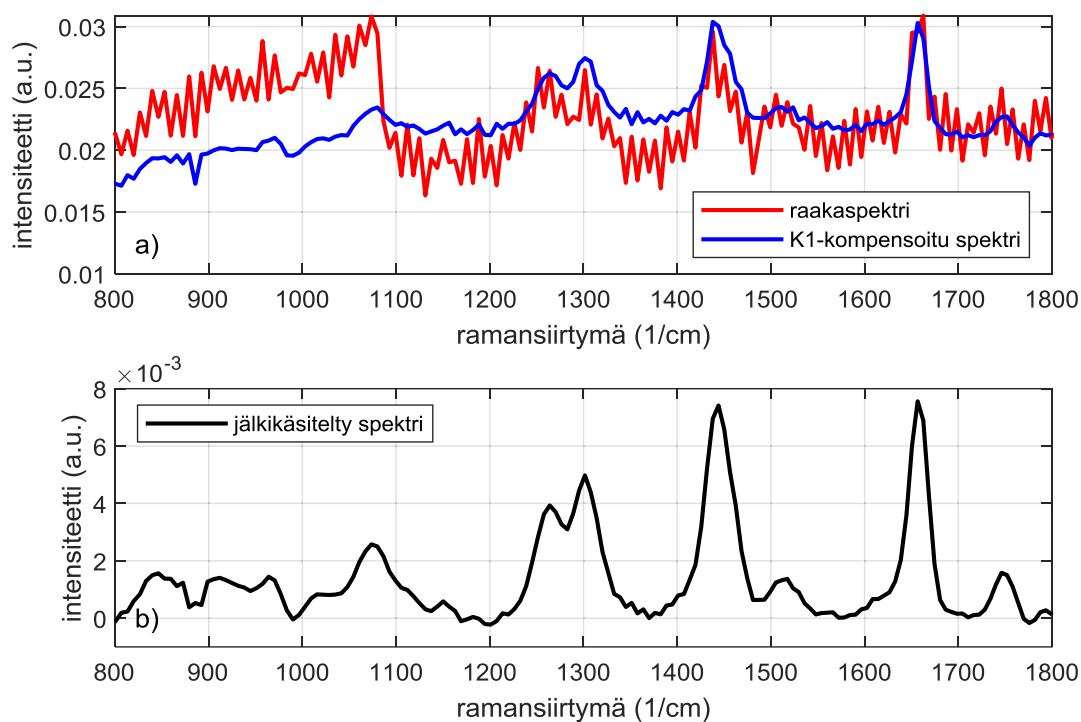
Kuva 24. 100 ps resoluutiolla mitattu tuoreen seesamiöljyn ramanspektri a) ilman kompensointia ja K1-kompensoinnin kanssa, b) jälkikäsittelyn jälkeen.



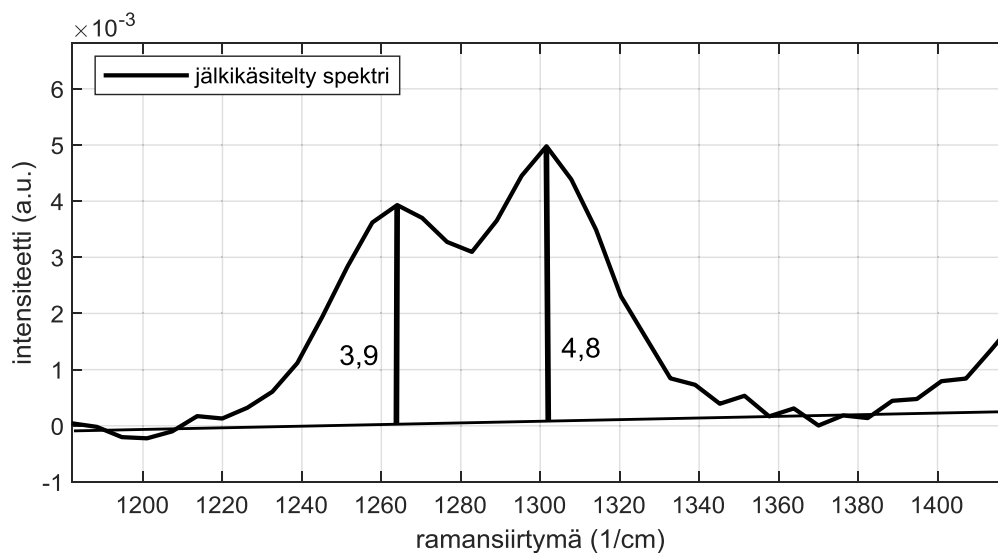


Kuva 25. 71 ps resoluutiolla mitattu tuoreen seesamiöljyn ramanspektri a) ilman kompensointia ja K1-kompensoinnin kanssa, b) jälkikäsitellyn jälkeen.

Seesamiöljyn fluoresenssitaso laskee ikääntymisen myötä ja matalamman fluoresenssitason näytteenä käytettiin vanhaa (pullo avattu vuosia sitten) seesamiöljyä. Vanhan seesamiöljyn spektri 100 ps resoluutiolla on esitetty kuvassa 26. Vanhan seesamiöljyn tapauksessa isommat ramanpiikit ovat nähtävissä jo raakaspektristäkin, mutta kompensointi tekee spektristä paljon helpommin luettavan. Kompensoinnin avulla saadaan myös näkymään yksityiskohtia, joita raakaspektristä ei voida erottaa. Kuvan 26 raakaspektrin perusteella voi arvioida tuplapiikissä  $1268 \text{ cm}^{-1} - 1302 \text{ cm}^{-1}$  molempien piikkien olevan yhtä suuria tai kohdan  $1268 \text{ cm}^{-1}$  piikin olevan hieman suurempi. Jälkikäsitellyn jälkeen on selvästi nähtävissä, että piikki kohdassa  $1302 \text{ cm}^{-1}$  on todellisuudessa suurempi. Suurennos tuplapiikistä on esitetty kuvassa 27. Suurennostesta laskettu piikkien korkeuksien suhde on 1,23. Muissa lähteissä tämän suhteen arvoksi annetaan seesamiöljylle 1,16 [41] tai 1,3 [40]. Spektriapiikkien korkeuksien suhteita käytetään näytteiden tunnistamisessa siinä missä piikkien paikkojakin, joten kompensointi on hyödyksi myös näytteillä, joissa spektriapiikkien paikat voidaan erottaa jo raakaspektristä.



Kuva 26. 100 ps resoluutiolla mitattu vanhan seesamiöljyn ramanspektri a) ilman kompensointia ja K1-kompensoinnin kanssa, b) jälkikäsiteltyä spektriä.



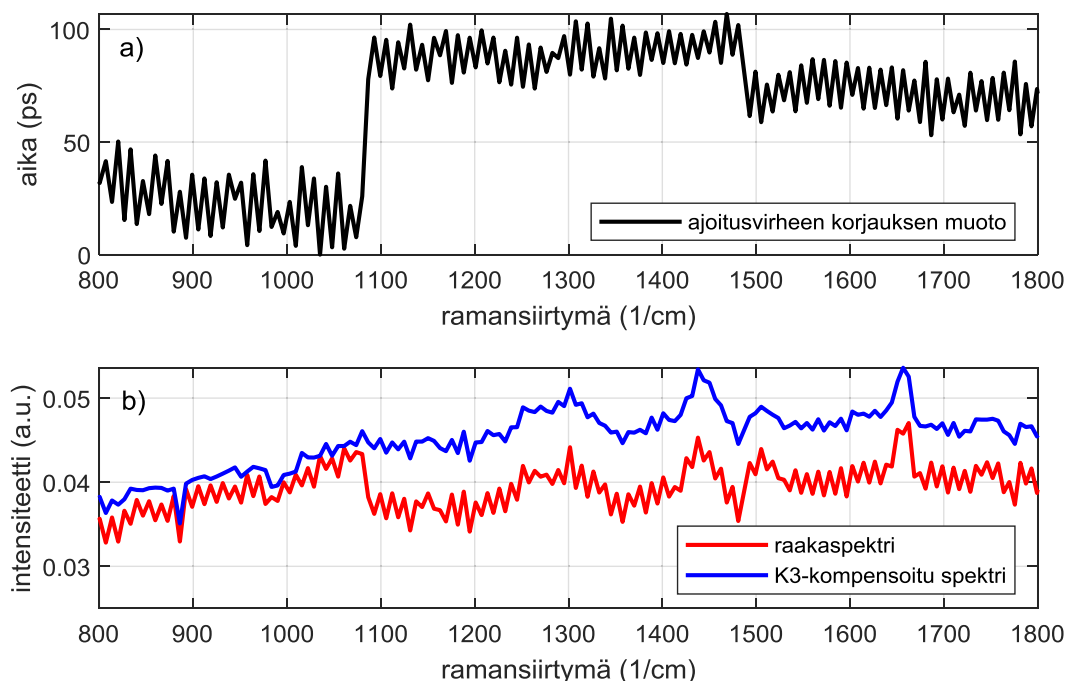
Kuva 27. Vanhan seesamiöljyn spektriin 1268  $\text{cm}^{-1}$  ja 1302  $\text{cm}^{-1}$  suhteelliset korkeudet.

### 7.3 Menetelmät M3 ja K3

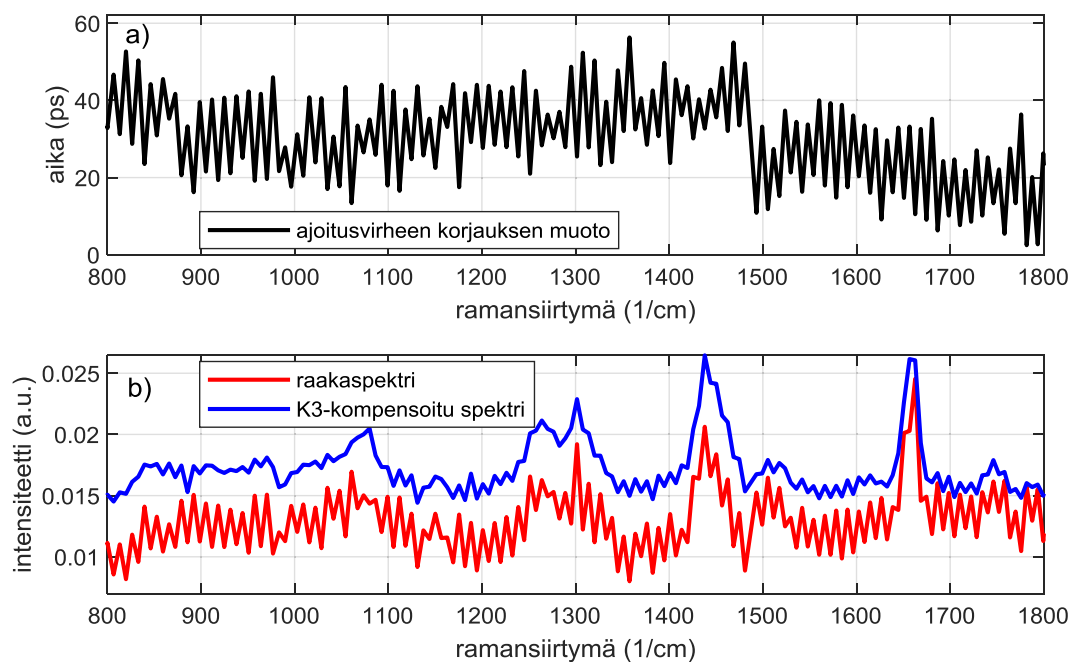
Menetelmän M3 mittauksissa ajoitettiin laserpulssin huippu likimain 2. aika-arvon keskelle (resoluutio 200 ps) tai 4. aika-arvon keskelle (resoluutiot 71 ps ja 100 ps). Jokaisella resoluutiolla suoritettiin yksi kalibrointinäytteen mittausta ja mittaustuloksista laskettiin histogrammin keskiarvo jokaisessa spektripisteessä käyttäen aika-arvoja 1-3 (resoluutio 200 ps) tai aika-arvoja 2-6 (resoluutiot 71 ps ja 100 ps). Vaihtelu keskiarvossa muunnettiin ajalliseksi vaihteluksi käyttäen aika-arvojen pituuksille nimellisarvoja. Ajallisesta vaihtelusta laskettiin kompensointiin K3 käytettävät korjauskäyrät, jotka on esitetty kuvissa 28 a) - 30 a).

Kompensoinnissa K3 spektreihin huomioitiin kaikki fotonit aika-arvoilta 1-2 (resoluutio 200 ps) tai 1-3 (resoluutiot 71 ps ja 100 ps) ja korjauskäyrän määräämä osuus seuraavan aika-arvon fotoneista. Vanhan seesamiöljyn spektrit K3-kompensoinnilla eri resoluutioilla on esitetty kuvissa 28 b) - 30 b).

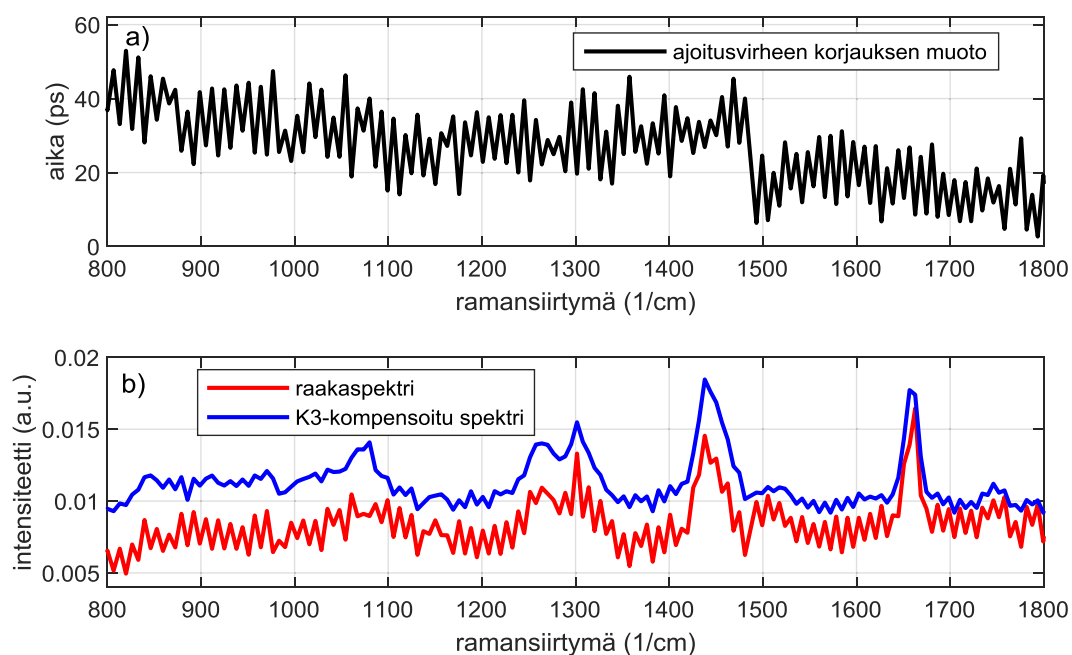
Kuvien 28-30 perusteella K3-kompensoinnilla saadaan vähennettyä ajoitusvirheestä spektriin muodostuvaa sahalaitakuviota kaikkialla vähintään noin 50% ja monin paikoin enemmän. Jokaisella resoluutiolla vanhan seesamiöljyn spektri on K3-kompensoinnin jälkeen jonkin verran raakaspektriä helpommin luettava, mutta uusia yksityiskohtia se tuo esiin vain  $1750\text{ cm}^{-1}$  piikissä, joka erottuu 71 ps ja 100 ps resoluutioilla kompensoinnin jälkeen merkittävästi paremmin. Tuoreen seesamiöljyn spektri 100 ps resoluutiolla K3-kompensoinnin jälkeen on esitetty kuvassa 31. Kuvan 31 perusteella korkean fluoresenssitason näytteellä K3-kompensointi edelleen vähentää spektrissä olevaa sahalaitakuviota, mutta ei riittävästi, jotta spektristä tulisi kunnolla luettava. Ainoastaan kaksi suurinta piikkiä voidaan tunnistaa spektristä. Menetelmien M3 ja K3 toimivuutta arvioitaessa on huomattava, että luvussa 6.4 esitetyt edellytykset 1 ja 2 menetelmien toimivuudelle toteutuvat nyt käytetyllä sensorilla huonosti. Laajempi TDC-piirin mittausalue ja pienempi vaihtelu aika-arvojen pituuksissa oletettavasti parantaisivat menetelmien M3 ja K3 toimivuutta nyt havaittuun verrattuna.



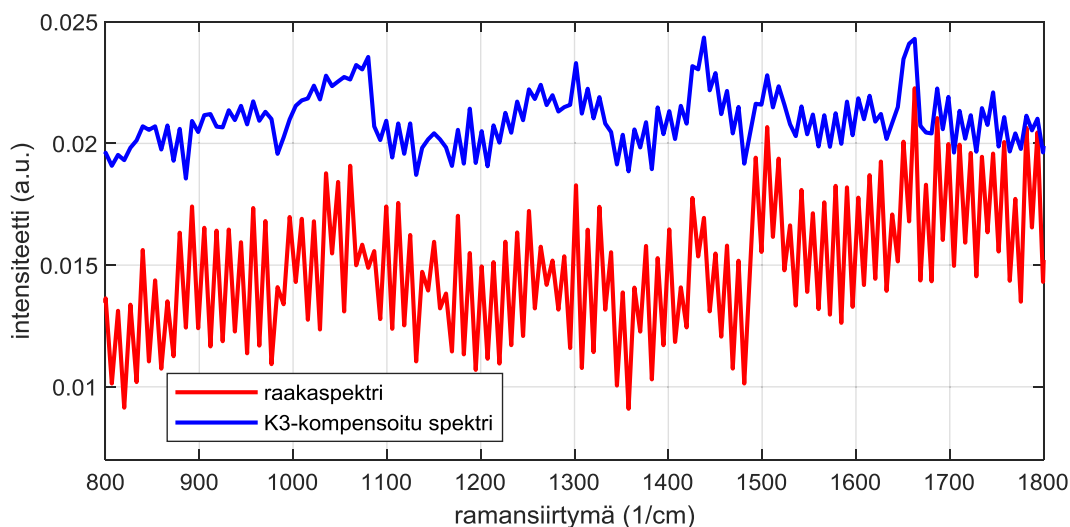
Kuva 28. a) Menetelmällä M3 muodostettu ajoitusvirheen korjauskäyrä, b) vanhan seesamiöljyn spektri ilman kompensointia ja K3-kompensoinnin kanssa. Resoluutio 200 ps.



Kuva 29. a) Menetelmällä M3 muodostettu ajoitusvirheen korjauskäyrä, b) vanhan seesamiöljyn spektri ilman kompensointia ja K3-kompensoinnin kanssa. Resoluutio 100 ps.



Kuva 30. a) Menetelmällä M3 muodostettu ajoitusvirheen korjauskäyrä, b) vanhan seesamiöljyn spektri ilman kompensointia ja K3-kompensoinnin kanssa. Resoluutio 71 ps.



Kuva 31. Tuoreen seesamiöljyn spektrin K3-kompensointi, resoluutio 100 ps.

#### 7.4 Laskukaava ajoitusvirheen vaikutusten arviointiin

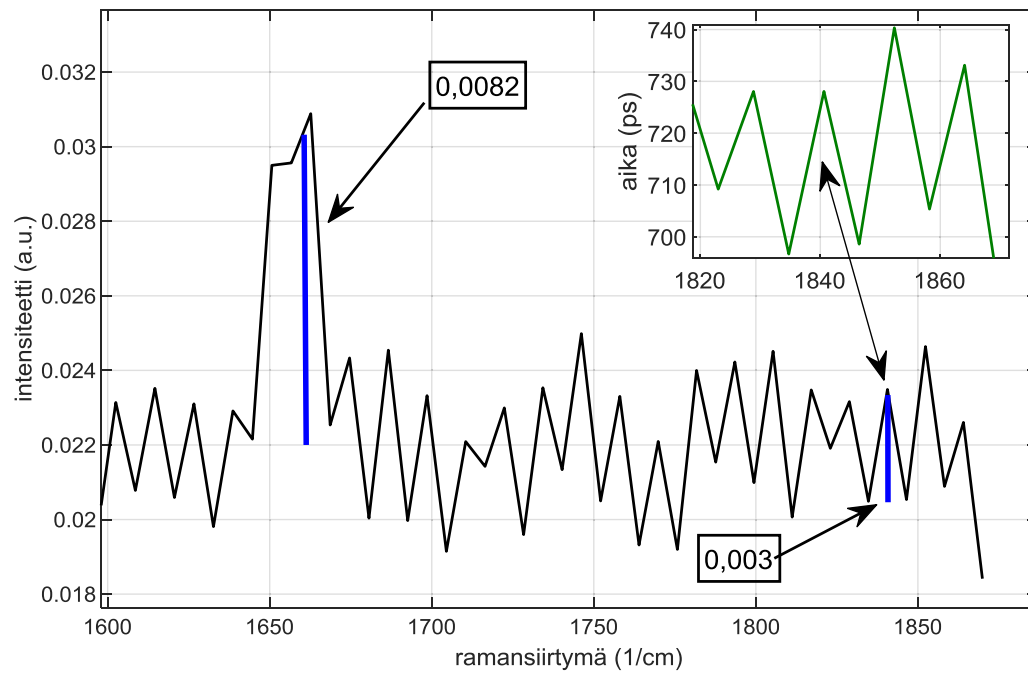
Luvussa 4.2 johdettiin simulointeja käyttäen kaava (10), jolla voidaan arvioida ajoitusvirheestä ramanspektriin aiheutuvan vääristymän suuruutta. Kaavan antamia tuloksia verrattiin todellisiin mittaustuloksiin vanhan seesamiöljyn mittausten yhteydessä.

Vanhalle seesamiöljylle määritettiin ensin fluoresenssin ja ramansironnan suhdeluku  $R_{F/R}$ . Määrittäessä mitattiin fluoresenssin taso mittausaikavälin ollessa noin 5 ns laserpulssin alkuhetkestä alkaen. Fluoresenssitaso kohdan  $1660 \text{ cm}^{-1}$  ramanpiikin vieressä oli 0,028. Seesamiöljylle fluoresenssin aikavakio  $\tau_F = 2 \text{ ns}$ , joten mittausaika oli noin 2,5 -kertainen fluoresenssin aikavakioon verrattuna. Tällä perusteella oletettiin fluoresenssifotoneista havaitun mittauksessa noin 92% ja rajoitetun mittausaikavälin vaikutuksesta korjatuksi fluoresenssitasoksi saatiin  $0,028/0,92 = 0,030$ . Tämän jälkeen määritettiin ramansironnan taso kohdan  $1660 \text{ cm}^{-1}$  piikissä käyttäen noin 800 ps mittausaikaväliä. Spektrin perusteella ramansironnan taso oli 0,001. Näin ollen kohdan  $1660 \text{ cm}^{-1}$  piikissä saatiin suhdeluvuksi  $R_{F/R} = 0,030/0,001 = 30$ .

Seesamiöljyn raakaspektristä laskettiin kohdan  $1660 \text{ cm}^{-1}$  ramanpiikin ja valitun ajoitusvirheestä johtuvan piikin suhteeksi  $R_{R/E} = 2,7$ . Laskussa käytetyt arvot ja suurennus ajoitusdatakuvasta on esitetty kuvassa 32. Ajoitusvirheestä johtuvaa piikkiä vastaavaksi ajoitusvirheeksi mitattiin ajoitusdatakuvaajasta 30 ps. Suhteen  $R_{R/E}$  arvo laskettiin kaavalla (10) käyttäen ajoitusvirheelle arvoa 30 ps, fluoresenssin ja ramansironnan suhteelle arvoa  $R_{F/R} = 30$  ja fluoresenssin aikavakiolle arvoa  $\tau_F = 2000 \text{ ps}$ . Näillä alkuarvoilla kaavalla (10) saadaan suhteeksi

$$R_{R/E} = \frac{2,15 \cdot 2000^{0,91}}{30 \cdot 30} = 2,4, \quad (14)$$

joka on melko lähellä spektristä määritettyä arvoa  $R_{R/E} = 2,7$ . Ainakin tässä tilanteessa kaavan (10) tulos on siis kaavan epätarkkuus huomioiden yhdenmukainen mittaustulosten kanssa.



Kuva 32. Kaavan (10) testauksessa käytetty spektri ja ajoitusdata.

## 8 POHDINTA

Tälle työlle asetettu tavoite voidaan jakaa neljään osaan. Tarkoituksena oli 1) selvittää, että miten aikaerotteisen sensorin ajoitusvirheet vaikuttavat mitattuun ramanspektriin, 2) kehittää menetelmä ajoitusvirheiden määrittämiseksi ilman erillistä karakterisointilaitteistoa, 3) kehittää menetelmä ajoitusvirheiden vaikutusten kompensoimiseksi ja 4) muodostaa vaatimusmäärittely seuraavan sensorin suunnittelua varten.

### 8.1 Kehitetyt menetelmät

Sensorin ajoitusvirheiden vaikutus ramanspektriin on mainittu useissa aiemmissa julkaisuissa, mutta asiaa ei ole tarkasteltu sen toteutuksesta ja periaatekuvaa yksityiskohtaisemmin. Luvun 4.2 tarkastelun perusteella voidaan johtopäätöksenä todeta, että optimaalisesti sijoitetun aikaportin tapauksessa ajoitusvirheistä spektriin syntyvä vääristymä seuraa suoraan spektripisteiden välisen aikaportin loppuhetken vaihtelun aiheuttamasta vaihtelusta havaittujen fotonien määrässä. Tämä johtopäätös yhdistää konkreettisesti epäideaalisuudet aikavälinmittauksessa ja mitatussa ramanspektrissä. Se selittää spektrin vääristymien syntymekanismin ja auttaa arvioimaan ajoitusvirheistä syntyvien ongelmien suuruutta erilaisia näytteitä mitattaessa. Tästä periaatteesta lähtien voitiin ajoitusvirheen vaikutuksen suuruuden arviointiin johtaa myös tyydyttävällä tarkkuudella toimiva laskukaava. Kaavan antaman tuloksen todettiin vastaavan mitattuja tuloksia hyvin luvussa 7.4 esitetyn mittauksen osalta.

Ajoitusdatan määrittämiseen kehitettiin kolme erilaista menetelmää (M1, M2 ja M3). Simuloinneissa menetelmä M1 osoittautui hyvin tarkaksi mutta hitaaksi ja menetelmä M3 tyydyttävän tarkaksi mutta nopeaksi menetelmäksi ajoitusdatan tuottamiseen. Menetelmän M2 käyttöä ei kannata harkita, ellei käytettävien aikavälinmittauspiirien resoluutio ole alle 10 ps.

Menetelmän M1 käyttöön tarvitaan lyhyen aikavakion fluoresoiva kalibrintinäyte sekä ajoitussignaalin tarkkaan säätöön sopiva säädettävä viive-elementti. Mikäli säädettävä viive-elementti on jo osana ramanspektrometriä, voidaan menetelmää M1 käyttää ilman mitään muutoksia laitteistoon. Simulointien perusteella menetelmällä M1 saadaan muodostettua sensorin ajoitusdata erittäin tarkasti. Simuloinneissa menetelmän M1 tarkkuutta rajoitti fluoresenssin raekohina, joka saadaan merkityksettömän pieneksi mittausaikaa kasvattamalla. Mittauksissa taas merkittävimmäksi virhelähteeksi nousi laserin tehotason vaihtelu, jota ei simuloinneissa oltu huomioitu lainkaan. Pahimmassa tapauksessa laserin keskimääräinen tehotaso muuttui yli 15% kahden peräkkäisen noin minuutin kestäneen mittausaskeleen välillä. Mittauksissa käytetyn laserin teknisissä tiedoissa tehotason vaihtelun luvataan olevan 10 minuutin aikavälillä alle  $\pm 2\%$  ja 6 tunnin aikavälillä alle  $\pm 5\%$ , mutta yhdessä kalibrintimittauksessa laserin tehotason vaihtelu ei pysynyt teknisten tietojen vaihteluvälillä koko mittausaikaa [42]. Mittauksissa siis paljastui menetelmän M1 olennaisena heikkoutena herkkyys laserin tehotason vaihtelulle, mutta on huomioitava, että mittauksissa käytetty laser on huollon tarpeessa ja normaalisti toimivalla laserilla menetelmän M1 tarkkuus on nyt mittauksissa saavutettua parempi.

Menetelmän M3 käyttöön tarvitaan vain lyhyen aikavakion fluoresoiva kalibrintinäyte eli sitä voidaan käyttää aina ilman mitään muutoksia laitteistoon. Sen käyttökelpoisuus riippuu sensorin aikavälinmittauspiirien ominaisuuksista: jos mittausalue on laaja ja aika-arvojen pituuksien vaihtelu on pientä, mutta ajoitusvirhettä on aika-arvojen paikoissa, menetelmä M3 voi olla hyvä tapa ajoitusvirheen muodon määrittämiseen. Aika-arvojen pituuksissa oleva vaihtelu vähentää menetelmän M3 tehoa selvästi. Mittauksissa menetelmällä M3 ja siihen liittyvällä kompensointimenetelmällä K3 saatiin kohtalaisen hyviä tuloksia ottaen huomioon

sen, että mittauksissa käytetty sensori ei ole mittausalueen laajuuden ja aika-arvojen pituuksien vaihtelun suhteen menetelmille M3 ja K3 optimaalinen.

Ajoitusvirheiden kompensointiin kehitetyistä menetelmistä menetelmä K1 toimi simulointien perusteella erittäin hyvin silloin, kun ajoitusdata on määritetty tarkasti ja aikavälinmittauspiirin resoluutio on alle 100 ps. Käytännössä on hyvin hankala tuottaa niin tarkkaa ajoitusdataa, että menetelmän K1 omat virhelähteet kasvaisivat merkittäviksi verrattuna ajoitusdatan määrittämisen epätarkkuudesta johtuviin virheisiin. Mikäli mitattavien näytteiden fluoresenssin aikavakio on noin 2 ns tai yli, menetelmän K1 omista virhelähteistä alkaa tulla merkittäviä vasta, kun aikavälinmittauspiirin resoluutio on noin 200 ps tai enemmän. Näytteen fluoresenssin aikavakion pienentyessä edelleen menetelmän K1 virhelähteet alkavat näkyä myös paremmilla resoluutioilla, mutta tällöinkin vasta erittäin tarkasti määritettyä ajoitusdataa käytettäessä. Ottaen huomioon ajoitusdatan määrittämisen epätarkkuudet voidaan noin 50 ps aikavälinmittauspiirin resoluutioilla menetelmää K1 pitää jo käytännössä virheettömänä.

Olettaen menetelmän K1 epätarkkuus merkityksettömäksi saadaan menetelmän K1 tuloksista välillisesti arvio menetelmän M1 tarkkuudelle tehdyissä mittauksissa. Simuloiden menetelmän K1 toimivuutta erilaisilla ajoitusdatan epätarkkuuksilla havaitaan menetelmän K1 toimivan likimain mittaustuloksia vastaavasti, kun ajoitusdataan lisätään virhettä 4 ps keskihajonnalla. Saatu 4 ps arvo on vain arvio, mutta simuloinneissa 2 ps arvon havaitaan olevan selvästi liian pieni ja 8 ps arvon olevan selvästi liian suuri mittaustuloksiin verrattuna. Näin ollen tämän työn mittauksissa menetelmällä M1 tuotetussa ajoitusdatassa voidaan sanoa olevan epätarkkuutta 3-6 ps keskihajonnalla.

Tässä työssä tehtyjen simulointien ja mittausten pohjalta menetelmiä M1 ja K1 arvioitaessa näyttää siis siltä, että menetelmän K1 epätarkkuus on olemattoman pientä menetelmän M1 epätarkkuuteen verrattuna. Menetelmän M1 epätarkkuuteen olennaisesti vaikuttavia tekijöitä ovat laserin tehotason vakaumus, raekohina eli kalibroitimittausten aika sekä aikavälinmittauspiirien aika-arvojen pituuksien vaihtelusta menetelmään M1 syntyvä virhe.

Luvun alussa esitetyistä tavoitteista tavoitteiden 1 ja 3 voidaan katsoa toteutuneen erittäin hyvin. Ajoitusvirheen ja spektrin vääristymien välinen yhteys on esitetty yksityiskohtaisesti ja ajoitusvirheen kompensointiin on kehitetty menetelmä, joka on yksinkertainen mutta tarkka (K1). Tavoitteen 2 voidaan katsoa toteutuneen melko hyvin. Ajoitusdatan määrittämiseen saatiin kehitettyä menetelmä, joka mahdollistaa ajoitusdatan määrittämisen ilman erillistä karakterisointilaitteistoa, mutta menetelmän nopeudessa ja tarkkuudessa on vielä parantamisen varaa.

## 8.2 Uuden sensorin vaatimusmäärittely

Tulevaisuudessa suunniteltavaa uutta sensoria on tarkoitus käyttää ramanspektroskopian lisäksi myös näytteen fluoresenssin aikavakion mittaamiseen. Fluoresenssimittausten takia mittausalueen pituus on oltava vähintään noin 5 ns. Tässä työssä kalibroitinäytteenä käytettyä erytrosiinia käytettäessä kalibroitimittausten vuoksi mittausalueen tulisi olla pituudeltaan noin 1,5 ns tai enemmän (laserpulssin puoliarvon leveyden ollessa 150 ps tai vähemmän), jotta menetelmään M3 ei aiheudu merkittävää virhettä mittausalueen pituudesta johtuen. Menetelmä M1 toimii hyvin myös lyhyemmällä mittausalueella. Varsinaisiin ramanspektroskopian mittauksiin tarvittava mittausalue riippuu ajoitusvirheiden suuruudesta ja käytettävästä laserista, mutta on joka tapauksessa suppeampi menetelmän M3 vaatimaan mittausalueeseen verrattuna. Fluoresenssimittauksista määräytyvä 5 ns mittausalue ylittää siis reilusti sekä ramanspektroskopian että tässä työssä esitettyjen kalibroitimittausten asettamat vaatimukset mittausalueen pituudelle.



Tämän työn aihetta hahmoteltaessa ajateltiin, että ajoitusvirheen kompensoinnin teho riippuu olennaisesti aikavälinmittauspiirin resoluutiosta. Työn keskeiseksi tutkimuskysymykseksi ajateltiin ajoitusvirheen kompensoinnin kannalta riittävän tarkan resoluution määrittämistä. Työn aikana havaittiin, että kehitettyjen menetelmien toimivuuden kannalta ajoitusdatan määrityksen tarkkuus on useimmissa tapauksissa resoluutiota merkittävämpi tekijä. Simulointien ja mittausten perusteella resoluution tulisi olla noin 100 ps tai parempi, jotta ajoitusvirheen kompensoinnin teho ei tipu huonosta resoluutiosta johtuen. Ainoastaan äärimmäisen tarkasti määritettyä ajoitusdataa (ajoitusdatassa virhettä alle 1 ps keskihajonnalla) käytettäessä ja näytteen fluoresenssin aikavakion ollessa alle 2 ns olisi resoluutionkin syytä olla parempi kuin 50 ps.

Kehitettyjen menetelmien toimivuuden ja ajoitusvirheiden suuruuden välillä vallitsee valitettava yhteys: mitä enemmän virhettä ajoituksessa, sitä enemmän epätarkkuutta käytettävissä menetelmissä. Erityisen ongelmallista on aika-arvojen pituuksien vaihtelu. Aika-arvojen pituuksien vaihtelu spektripisteiden välillä aiheuttaa systemaattista virhettä muodostettaessa ajoitusdataa menetelmällä M1 ja kompensoitaessa ajoitusvirhettä menetelmällä K3. Aika-arvojen pituuksien vaihtelu saman spektripisteen sisällä taas aiheuttaa epätarkkuutta menetelmään M3. Simuloinneissa havaittiin myös ajoitusvirheen muodolla olevan merkitystä spektrin luettavuuden kannalta. Mikäli mittausaluetta on käytössä riittävästi, tasaisesti muuttuva poikkeama (esimerkiksi 1 ps/spektripiste) ajoituksessa on spektrin luettavuuden kannalta pienempi ongelma kuin spektripisteestä toiseen jatkuvasti vaihteleva poikkeama.

Seuraavan sensorin aikavälinmittauspiirien resoluutioksi sopii tämän työn perusteella noin 50 ps. Suunnittelu-aika, joka kuluisi tätä tarkemman resoluution omaavien aikavälinmittauspiirien suunnitteluun kannattaa mieluummin käyttää piirikuvion huolellisempaan suunnitteluun ja ajoitusvirheen, erityisesti aika-arvon pituuksien vaihtelun minimointiin. Mikäli aika-arvojen pituuksien vaihtelua voidaan vähentää jollain sellaisella piiriteknisellä ratkaisulla, joka vaatii resoluution muuttamista ehdotetusta 50 ps arvosta, kannattaa kaikkia resoluutiota alle 100 ps tasolla harkita. Tarkempaa kuin 50 ps resoluutiota on syytä harkita, mikäli laserpulssin leveys ja SPAD-ilmaisimen jitteri pienenevät merkittävästi tässä työssä tarkastelluista (laserpulssin leveys 70 ps FWHM ja SPAD-ilmaisimen jitteri 50 ps FWHM) tai mikäli sensoria käytetään tavanomaisen ramanspektroskopian lisäksi soveltaviin mittauksiin, joissa aikaerotteisuudella on fluoresenssin vähentämisen lisäksi muutakin käyttöä. Tällainen soveltava mittaus voi olla esimerkiksi syvyyskannaus, jossa aikaportin paikkaa säätelemällä saadaan tietoa näytteen koostumuksesta eri syvyyksillä näytteen pinnasta [20].

Tavoite uuden piirin vaatimusmäärittelyn muodostamisesta voidaan katsoa täyttyneeksi, sillä ehdotetulle 50 ps resoluutiolle on löydetty perustelut simulointi- ja mittaustuloksista. Lisäksi uuden piirin suunnittelussa kannattaa huomioida tieto siitä, että kompensointimenetelmien toimivuuden kannalta keskeistä on aika-arvojen pituuksien vaihtelun minimointi.

## 9 YHTEENVETO

Mitattaessa voimakkaasti fluoresoivia näytteitä tässä työssä käytetyllä laitteistolla ajoitusvirheet ovat tulosten merkittävin virhelähde. Tässä työssä selvitettiin aikaerotteisen sensorin ajoitusvirheiden vaikutus mitattuun ramanspektriin ja kehitettiin menetelmät sensorin ajoitusdatan määrittämiseen sekä ajoitusvirheen kompensointiin. Tavoitteena oli, että kehitettäviä menetelmiä voidaan käyttää sensorin ollessa paikallaan ramanspektrometrissä eikä laitteistoon tarvitsisi tehdä muutoksia sensorin ajoitusdatan määrittystä varten. Lisäksi määritettiin sopiva aikavälinmittauspiirin resoluutio tulevaisuudessa suunniteltavalle uudelle sensorille.

Ajoitusdatan määrittämiseen kehitetty tarkempi menetelmä (M1) muodostuu kahdesta eri mittausvaiheesta. Ensimmäisessä vaiheessa määritetään aikavälinmittauspiirien aika-arvojen pituudet suhteessa toisiinsa jatkuvaa valonlähdettä käyttäen. Toisessa vaiheessa määritetään kahden valitun aika-arvon paikkojen aikaero säädettävän viive-elementin ja lyhyen aikavälin fluoresoivan näytteen avulla. Mittaustulosten perusteella voidaan laskea sensorin ajoitusdata. Menetelmä osoittautui pääosin hyvin toimivaksi, heikkoutena laserin tehotason vaihtelusta sekä määritettävien aika-arvojen pituuksien vaihtelusta syntyvä virhe. Työssä käytetyn laserin tehotason vaihtelu oli tavallista suurempaa, joten oletettavasti hyvin toimivalla laserilla tehotason vaihtelun vaikutus menetelmän tarkkuuteen on tässä työssä havaittua vähäisempi.

Ajoitusvirheen yleismuodon määrittämiseen kehitettiin myös nopeampi menetelmä (M3), jossa mitataan lyhyen aikavälin fluoresoivaa näytettä ja lasketaan havaittavan valopulssin paikka tuloshistogrammin keskiarvona. Ajoitusvirheen yleismuoto saadaan keskiarvon vaihtelusta spektripisteiden välillä. Menetelmän etuna on nopeus ja yksinkertaisuus ja suurimpana heikkoutena aika-arvojen pituuksien vaihtelusta ja suppeasta mittausalueesta syntyvä virhe.

Sekä tarkemmalla että nopeammalla menetelmällä määritettyä ajoitusdataa käytetään ajoitusvirheen kompensointimenetelmissä (K1 ja K3) periaatteessa samalla tavalla. Ajoitusdatasta, valitusta aikaportin loppuhetkestä ja havaituista fotonimääristä lasketaan korjaus, jolla pyritään kompensoimaan ajoitusvirheiden vaikutus. Tyypillisesti korjaus on merkittävästi tarkempi, mikäli ajoitusdata on määritetty jokaisen aika-arvon kattaen (menetelmällä M1) eikä vain yleismuodon osalta (menetelmällä M3), koska tällöin korjausta laskettaessa voidaan käyttää aikavälinmittauspiirien aika-arvojen pituuksille todellisia arvoja nimellisarvojen sijaan.

Ajoitusvirheistä aiheutuvista spektrin vääristymistä saatiin menetelmiä M1 ja K1 käyttämällä poistettua yli 70%. Mittaustulosten perusteella ajoitusvirheiden vääristämästä spektristä voidaan saada menetelmiä M1 ja K1 käyttäen esille yksityiskohtia, jotka muuten jäisivät kokonaan vääristymien peittoon. Spektrin tarkentumisen myötä myös spektriipiikkien suhteellisia kokoja voidaan tarkastella merkittävästi paremmin kuin ilman kompensointia. Mittaustulosten perusteella menetelmiä M3 ja K3 käyttäen spektrin vääristymiä voidaan vähentää yli 50%, jolloin spektri on kompensoinnin jälkeen helpommin luettavissa. Kokonaan uutta tietoa spektristä saadaan näillä menetelmillä mittauksissa käytetyn sensorin tapauksessa vain vähän.

Kehitettyjä menetelmiä tarkastelemalla voidaan todeta, että laserpulssin leveyden ollessa noin 70-150 ps (FWHM) ja SPAD-ilmaisimen jitterin ollessa noin 50-100 ps (FWHM) aikaerotteisessa ramanspektroskopiassa käytettävän sensorin TDC-piirien resoluutioksi sopii noin 50 ps. Tätä tarkemmasta resoluutiosta voi olla hyötyä, mikäli laitteistoa käytetään tarkkaa resoluutiota vaativiin soveltaviin mittauksiin tai laseripulssin leveys ja SPAD-ilmaisimen jitteri pienenevät merkittävästi edellä mainittuihin arvoihin verrattuna.

## 10 LÄHTEET

- [1] Kong K. et al. (2015) Raman Spectroscopy for Medical Diagnostics – From in-vitro Biofluid Bssays to in-vivo Cancer Detection. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 89, s. 121-134.
- [2] Khandasammy R. et al. (2018) Bloodstains, Paintings, and Drugs: Raman Spectroscopy Applications in Forensic Science. *Forensic Chemistry*, vol. 8, s. 111-133.
- [3] Fini G. et al. (2004) Applications of Raman Spectroscopy to Pharmacy. *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 35, s. 335-337.
- [4] Bersani D. et al. (2016) Raman Spectroscopy of Minerals and Mineral Pigments in Archaeometry. *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 47, s. 499-530.
- [5] Nissinen I. et al. (2015) A 2x(4)x128 Multi-time-gated SPAD Line Detector for Pulsed Raman Spectroscopy. *IEEE Sensors Journal*, vol. 15, no. 3, s. 1358-1365.
- [6] Maruyama Y. et al. (2014) A 1024x8, 700-ps Time-Gated SPAD Line Sensor for Planetary Surface Exploration with Laser Raman Spectroscopy and LIBS. *IEEE Journal of Solid-State Circuits* vol. 49, no. 1, s. 179-189.
- [7] Raman C.V. (1928) A New Radiation. *Indian Journal of Physics* 2, s. 387-398.
- [8] Larkin P. (2011) *Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation*. Elsevier.
- [9] Linne M. A. (2002) *Spectroscopic Measurement: An Introduction to the Fundamentals*. Academic Press.
- [10] Nissinen I. et al. (2011) A Sub-ns Time-gated CMOS Single Photon Avalanche Diode Detector for Raman Spectroscopy. In: *European Solid-State Device Research Conference*, September 12-16, Helsinki.
- [11] Chase D. B. (1991) Modern Raman Instrumentation and Techniques. In: Grasseli J. & Bulkin B (toim.) *Analytical Raman Spectroscopy*. John Wiley & Sons, s. 21-31.
- [12] Bulkin B. J. (1991) The Raman Effect: An introduction. In: Grasseli J. & Bulkin B (toim.) *Analytical Raman Spectroscopy*. John Wiley & Sons, s.1-3.
- [13] Kneipp, J. & Lasch P. (2008) *Biomedical Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons.
- [14] Ploem J. S. (1999) Fluorescence Microscopy. In: Mason W. T. (toim.) *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis*. Academic Press, s. 4.
- [15] Goluk K. et al. (2006) Is Photobleaching Necessary for Raman Imaging of Bone Tissue Using a Green Laser? *Biochimica et Biophysica Acta* 1758, s. 868-873.
- [16] Kostamovaara J. et al. (2013) Fluorescence Suppression in Raman Spectroscopy Using a time-gated CMOS SPAD. *Optics Express* vol. 21, no. 25, s. 31632-31645.
- [17] Gerrad D. L. (1991) Organic and Petrochemical Applications of Raman Spectroscopy. In: Grasseli J. & Bulkin B (toim.) *Analytical Raman Spectroscopy*. John Wiley & Sons, s. 313-317.
- [18] Robert B. (2009) Resonance Raman Spectroscopy. *Photosynthesis research*, vol. 101, s. 147-155.
- [19] Wei D. et al. (2015) Review of Fluorescence Suppression Techniques in Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 50, no. 5, s. 387-406.
- [20] Kekkonen J. et al. (2018) Distance-Resolving Raman Radar Based on a Time-Correlated CMOS Single-Photon Avalanche Diode Line Sensor. *Sensors*, vol. 18, no. 10.

- [21] Gebrekidan M. T. et al. (2015) A Shifted-Excitation Raman Difference Spectroscopy (SERDS) Evaluation Strategy for the Efficient Isolation of Raman Spectra From Extreme Fluorescence Interference. *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 47, s. 198-209.
- [22] Nissinen I. et al. (2016) On the Effects of the Time Gate Position and Width on the Signal-to-Noise Ratio for Detection of Raman Spectrum in a Time-Gated CMOS Single-Photon Avalanche Diode Based Sensor. *Sensors and Actuators*, vol. 241, s. 1145-1152.
- [23] Van Duyne R. P. et al. (1974) Mode-Locked Laser Raman Spectroscopy – A New Technique for the Rejection of Interfering Background Luminescence Signals. *Analytical Chemistry*, vol. 46, no. 2, s. 213-222.
- [24] Matousek P. et al. (2001) Fluorescence Suppression in Resonance Raman Spectroscopy Using a High-Performance Picosecond Kerr Gate. *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 32, s. 983-988.
- [25] Ebrecht R. et al. (2014) Fluorescence Lifetime Imaging in the Medical Sciences. *Protoplasma*, vol. 251, no. 2, s. 293-305.
- [26] Ariese F. et al. (2009) Picosecond Raman Spectroscopy with a Fast Intensified CCD Camera for Depth Analysis of Diffusely Scattering Media. *Analyst*, vol. 134, s. 1192-1197.
- [27] Cova S. et al. (1996) Avalanche Photodiodes and Quenching Circuits for Single-Photon Detection. *Applied Optics*, vol. 35, no. 12, s. 1956-1976.
- [28] Rochas A. et al. (2003) Single Photon Detector Fabricated in a Complementary Metal-Oxide-Semiconductor High-Voltage Technology. *Review of Scientific Instruments*, vol. 74, no. 7, s. 2363-2370.
- [29] Nissinen I. et al. (2018) A 16x256 SPAD Line Detector with a 50-ps, 3-bit, 256-channel Time-to-Digital Converter for Raman Spectroscopy. *IEEE Sensors Journal*, vol. 18, no. 9, s. 3789-3798.
- [30] Blacksberg J. et al. (2011) Fast Single-Photon Avalanche Diode Arrays for Laser Raman Spectroscopy. *Optics Letters*, vol. 36, no. 18, s. 3672-3674.
- [31] Krstajić, N. et al. (2014) A 256x8 SPAD Line Sensor for Time Resolved Fluorescence and Raman Sensing. In: *European Solid State Circuits Conference*, September 22-26, Venetsia, Italia.
- [32] Spinelli A. et al. (1997) Physics and Numerical Simulation of Single Photon Avalanche Diodes. *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 44, no. 11, s. 1931-1943.
- [33] Xu H. et al. (2017) Design and Characterization of a p+/n-well SPAD Array in 150nm CMOS Process. *Optics Express*, vol. 25, no. 11, s. 12765-12778.
- [34] Li Z. et al. (2014) Towards a Portable Raman Spectrometer Using a Concave Grating and a Time-Gated CMOS SPAD. *Optics Express*, vol. 22, no. 15, s. 18736-18747.
- [35] Holma J. et al. (2017) Characterization of the Timing Homogeneity in a CMOS SPAD Array Designed for Time-Gated Raman Spectroscopy. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, vol. 66, no. 7, s. 1837-1844.
- [36] Nikkinen J. et al. (2018) Sub-100 ps Monolithic Diamond Raman Laser Emitting at 573 nm. *IEEE Photonics Technology Letters*, vol. 30, no. 11, s. 981-984.
- [37] Nissinen J. et al. (2018) Time-gated CMOS SPAD and a Quantum Well Laser Diode with a CMOS driver for Time-Resolved Diffuse Optics Imaging. In: *IEEE Nordic Circuits and Systems Conference*, October 30-31, Tallinna, Viro.
- [38] Boens N. et al. (2007) Fluorescence Lifetime Standards for Time and Frequency Domain Fluorescence Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, vol. 79, no. 5, s. 2137-2149.

- [39] General Radio Catalog 73 (1972) (luettu 17.10.2018). General Radio Company, Concord. URL: [https://www.ietlabs.com/pdf/Datasheets/GenRad\\_1973\\_Catalog.pdf](https://www.ietlabs.com/pdf/Datasheets/GenRad_1973_Catalog.pdf)
- [40] Raman Spectra of Cooking Oils (luettu 19.10.2018). Process Instruments. URL: [https://vw-process-instruments-inc.storage.googleapis.com/uploads/2016/04/28/files/PI\\_Raman\\_Cooking\\_Oils.pdf](https://vw-process-instruments-inc.storage.googleapis.com/uploads/2016/04/28/files/PI_Raman_Cooking_Oils.pdf)
- [41] Baeten V. et al. (1998) Oil and Fat Classification by FT-Raman Spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 46, s. 2638-2646.
- [42] Laser Head ANG-500P-CHS Customer Information (2017). Teem Photonics, Meylon, Ranska.

## **11 LIITTEET**

Liite 1 Kompensointimenetelmien M1-M3 simulointeihin käytetty MATLAB-koodi

Liite 2 Ajoitusdatan muodostamiseen menetelmällä M1 käytetty MATLAB-koodi

Liite 3 Mittaustulosten K1-kompensointiin käytetty MATLAB-koodi

Liite 4 Ajoitusdatan muodostamiseen menetelmällä M3 ja mittaustulosten kompensointiin menetelmällä M3 käytetty MATLAB-koodi

## Liite 1 Kompensointimenetelmien M1-M3 simulointeihin käytetty MATLAB-koodi

```

clear;
close all;
set(0,'defaultfigurecolor',[1 1 1])
measTime = 10;           % mittausaika (s)
nMeas = measTime*600;    % "kalibrointivakio" mittausajalle, muutettava TG:n
mukaan
TG = 500;                % aikaportin loppu (ps)
FRratio = 150;
PRa = 334.3*15e-12/FRratio;
PRa2= 334.3*15e-12/FRratio;
PRa3 =334.3*12e-12/FRratio;
ELA = 1000e-12;          % laser pulssin energia
tStep = 1e-12;           % aika-stepin koko
tMax = 50e-9;            % aika-akselin viimeinen piste
SigmaGauss = 64e-12;     % laser pulssin sigma
SigmaSPAD = 34e-12;      % SPAD sigma
SigmaAll = sqrt(SigmaGauss^2 + SigmaSPAD^2); % laserin ja SPADin yht.
sigma
tGauss = 0.3e-9;         % gaussin pulssin keskipisteen paikka aika-
akselilla
tGaussCal = 0.5e-9;      % laserpulssein paikka kalibroinnissa
tauFluor = 2e-9;         % Fluoresenssin aika-vakio
tauFluorCal = 0.09e-9
t = 0:tStep:tMax;
fitAxis = transpose([1:100]);

Nbin = 20;              % bin lkm
Wbin = 50;              % binin nimellisleveys (ps)
Sbin = 2;               % leveyden vaihtelun keskihajonta (ps)
linSkew = 2;            % lineaarinen virhe 1. binin leveydessä (ps/spektripiste)
BBE = 3;                % Skew määrittelyn virheen sigma ("BinBoundaryError")

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% LUODAAN IDEAALINEN SPEKTRI %%%%%%%%%%%%%
EF1 = 1e-12;
% Fluoresenssin energia
x = nMeas*ELA*exp(-(tGauss-t).^2/(2*SigmaAll^2))/sqrt(2*pi*SigmaAll^2);
% laserpulssi
xf = EF1*exp(-t/tauFluor)/tauFluor; % Fluoresenssin ideaalinen aikavaste
impulssille eli elinaika
y = conv2(x,xf);
y1 = y(1:(length(y)+1)/2));
% Ja kalibrointinäytteen fluoresenssi
xCal = nMeas*ELA*exp(-(tGaussCal-
t).^2/(2*SigmaAll^2))/sqrt(2*pi*SigmaAll^2); % laserpulssi
xfCal = EF1*exp(-t/tauFluorCal)/tauFluorCal; % Fluoresenssin ideaalinen
aikavaste impulssille eli elinaika
yCal = conv2(xCal,xfCal);
y1Cal = yCal(1:(length(yCal)+1)/2));
y1CalN = sqrt(y1Cal);
for i=1:100
y1CalNAR(i,:) = normrnd(0,y1CalN,1,50001);
end
y1CalNOISE = y1Cal + y1CalNAR;

for i = 1:100
switch i<101
% Raman -spektrin muodostus kolmesta gaussin pulssin muotoisesta

```





```

%%%%%%%% MUODOSTETAAN SPEKTRIT KOMPENSAATIOILLA K1 JA K2 SEKÄ ILMAN %%%%
TGbin = round(TG/Wbin); % Ilman kompensointia luetaan spektri TGbiniin
saakka
for j = 1:100
SumNoComp(j)=sum(Histogram(j,1:TGbin),2);
end
% Kompensointi K2, haetaan TG:n sisältävä aikaväli ja otetaan mukaan
% kaikki fotonit ennen tätä väliä
for j = 1:100
for i = 1:Nbin % Haetaan viimeisen täyden binin indeksi
K2Bin
    if BinBoundary(j,i) < TG
        K2Bin(j)=i;
    end
end
end
for j=1:100
SumK2Comp(j)=sum(Histogram(j,1:K2Bin(j)),2); % Muodostetaan kompensoidut
summat
end
% Kompensointi K1, haetaan TG:n sisältävä aikaväli ja otetaan mukaan
% kaikki fotonit ennen tätä väliä, lisäksi murto-osa TG:n sisältävästä
% välistä
% Lasketaan murto-osat ja niiden fotonikertymät
for j=1:100
Share(j) = (TG-BinBoundary(j,(K2Bin(j))))/(BinBoundary(j,K2Bin(j)+1)-
BinBoundary(j,K2Bin(j)));
SharePhotons(j) = Share(j)*Histogram(j, K2Bin(j)+1);
SumK1Comp(j) = SumK2Comp(j)+SharePhotons(j);
end

for j=1:100
ShareReal(j) = (TG-
BinBoundaryReal(j,(K2Bin(j))))/(BinBoundaryReal(j,K2Bin(j)+1)-
BinBoundaryReal(j,K2Bin(j)));
SharePhotonsReal(j) = ShareReal(j)*Histogram(j, K2Bin(j)+1);
SumK1CompReal(j) = SumK2Comp(j)+SharePhotonsReal(j);
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Menetelmät M3 ja K3 %%%%%%%%%
% Ensin M3
% Lasketaan histogrammista keskiarvo olettaen osien leveydet yhtä suuriksi
for j = 1:100
for i = 1:Nbin
    SumWeight(j,i) = i*HistogramCal(j,i);
end
HistoCalkA(j)=sum(SumWeight(j,1:Nbin))/sum(HistogramCal(j,1:Nbin));
HistoCalkAps(j)=HistoCalkA(j)*Wbin;
end
HistoCalkApsZero=HistoCalkAps-min(HistoCalkAps); % Tässä korjauksen
yleislinja nollassoon verrattuna
GraphLine=800-HistoCalkApsZero;
% Sitten K3:
% Lähtökohtaisesti aikaportin loppuhetki on TGbin, joka on määritetty
aiemmin
% Lisätään tähän yleislinjan mukaisesti kokonaisa nimellisleveyden pinnejä
% tai osia
FullBins=floor(HistoCalkApsZero/Wbin); % Kokonaisten pinnien määrä

```

```
ShareNotInFulls=(HistoCalKApsZero-Wbin*FullBins)/Wbin; % Loppuosa osuutena
kokonaisesta pinnistä
```

```
for j = 1:100
SumK3Comp(j)=sum(Histogram(j,(1:TGbin+FullBins(j)))) +
ShareNotInFulls(j)*Histogram(j,TGbin+FullBins(j)+1);
end
```

```
FR_ratio_spektripiste20 = sum(y1)/sum(RA(20,:))
FR_ratio_gated_spektripiste20 = sum(y1(1:TG))/sum(RA(20,1:TG))
```

```
figure(1);
subplot(6,1,2), plot(fitAxis,SumNoComp,'LineWidth',1.5,'Color','k');
title('Kompensoimaton spektri')
subplot(6,1,3), plot(fitAxis,SumK2Comp,'LineWidth',1.5,'Color','k');
title('K2-kompensoitu spektri')
subplot(6,1,4), plot(fitAxis,SumK1Comp,'LineWidth',1.5,'Color','k');
title('K1-kompensoitu spektri')
subplot(6,1,5), plot(fitAxis,SumK1CompReal,'LineWidth',1.5,'Color','k');
title('K1-kompensoitu spektri, ajoitusdatassa virhettä')
subplot(6,1,1), plot(fitAxis,SumIdeal,'LineWidth',1.5,'Color','k');
title('Ideaalinen spektri')
subplot(6,1,6), plot(fitAxis,SumK3Comp,'LineWidth',1.5,'Color','k');
title('K3-kompensoitu spektri')
```

```
figure(2);
p1 = plot (fitAxis,BinBoundary);
hold on
p2 = plot(fitAxis,GraphLine,'LineWidth',2,'Color','k');
title('Ajoitusdata ja menetelmän M3 tuottama yleismuoto')
```

## Liite 2 Ajoitusdatan muodostamiseen menetelmällä M1 käytetty MATLAB-koodi

```

clear;
close all;
format long;
set(0,'defaultfigurecolor',[1 1 1])
filename = 'testCAL50.mat';
DCRfolder = 'DCR50M';
DCRfirst_subfolder = 16;      % DCR-mittaukset
DCRlast_subfolder = 40;
DCfolder = 'DC50M';
DCfirst_subfolder = 0;      % DC-valolla tehdyt mittaukset
DClast_subfolder = 1;
DCfolder_n = DClast_subfolder-DCfirst_subfolder+1;
T1folder = 'T1PIN2';
T1first_subfolder = 1;      % 1. pinnin keskikohdan etsinnän mittaus
T1last_subfolder = 101;
T1folder_n = T1last_subfolder-T1first_subfolder+1;
T1pin = 3; % T1 pinni matlabin numeroinnilla (1-8)
T2folder = 'T2PIN5';
T2first_subfolder = 102;    % viimeisen pinnin keskikohdan etsinnän
mittaus
T2last_subfolder = 222;
T2folder_n = T2last_subfolder-T2first_subfolder+1;
T2pin = 6; % T2 pinni matlabin numeroinnilla (1-8)

mode = 2;      % Huipun haun menetelmä: keskiarvo (1)/ polynomin sovitus
(2)
deg = 5;      % Sovitettavan polynomin asteluku
TV = 804.29;   % Vakioviive (ps) 3,3373 ps/mm, parhaassa 50M
mittauksessa 804,29 ja 70M mittauksessa 637,42, 25M: 1496,2
Tstep = 3.3373; % Sweepausten askeleen koko (ps)
offset = 100;  % Offset ajoitusdatan siirtämiseen ylös tai alas
%fitwidth = 10; % Modessa 3 sovitetaan käyrää näin monta pistettä
keskikohdan molemmin puolin

% Luetaan mittaustulokset
for k = DCRfirst_subfolder:DCRlast_subfolder
fileID = fopen(['.\',DCRfolder,'\ ',num2str(k),'\A.txt']);
fileID;
for i = 1:256
for j = 1:8
D((k-DCRfirst_subfolder+1),i,j) = textscan(fileID,'%u',1);
end
end
fclose(fileID);
end
DCRM=double(sum(cell2mat(D)));
DCR=DCRM./sum(DCRM(1,1,:));

for k = DCfirst_subfolder:DClast_subfolder
fileID = fopen(['.\',DCfolder,'\ ',num2str(k),'\A.txt']);
fileID;
for i = 1:256
for j = 1:8
A((k-DCfirst_subfolder+1),i,j) = textscan(fileID,'%u',1);
end
end
fclose(fileID);

```

```

end
DCM=double(cell2mat(A));

for k = T1first_subfolder:T1last_subfolder
fileID = fopen(['.\',T1folder,'\ ',num2str(k),'\A.txt']);
fileID;
for i = 1:256
for j = 1:8
B((k-T1first_subfolder+1),i,j) = textscan(fileID,'%u',1);
end
end
fclose(fileID);
end
T1M=double(cell2mat(B));

for k = T2first_subfolder:T2last_subfolder
fileID = fopen(['.\',T2folder,'\ ',num2str(k),'\A.txt']);
fileID;
for i = 1:256
for j = 1:8
C((k-T2first_subfolder+1),i,j) = textscan(fileID,'%u',1);
end
end
fclose(fileID);
end
T2M=double(cell2mat(C));
% Mittaustulokset luettu

% Lasketaan DC-mittauksesta hittien määrä kaavan 11 nimittäjään
sum_measDC = sum(DCM);
sum_bins = sum(sum_measDC,2);

k11_nimittaja(:)=sum(sum_measDC(1,:,T1pin+1:T2pin-
1),3)+0.5*(sum_measDC(1,:,T1pin)+sum_measDC(1,:,T2pin));

T1PIN2(:,:,:) = T1M(:,:T1pin);
T2PIN5(:,:,:) = T2M(:,:T2pin);
if mode == 1
% Määritetään T1
for s = 1:256
[T1maxValue20, T1Index20] = maxk(T1PIN2(:,s,:),20);
indexT1(s)=mean(T1Index20);
end
% Määritetään T2
for s = 1:256
[T2maxValue20, T2Index20] = maxk(T2PIN5(:,s,:),20);
indexT2(s)=mean(T2Index20);
end
end

% Määritetään T1 ja T2 sovitettun polynomin huipuista
if mode == 2
XT1 = (1:1:size(T1PIN2,1));
XT2 = (1:1:size(T2PIN5,1));
for s=1:256
p1 = polyfit(XT1,transpose(T1PIN2(:,s)),deg);
p2 = polyfit(XT2,transpose(T2PIN5(:,s)),deg);

C1(s,:) = polyval(p1,1:0.1:size(T1PIN2,1));

```

```

C2(s,:) = polyval(p2,1:0.1:size(T2PIN5,1));

[T1maxValue,T1Index]=max(C1(s,:));
indexT1(s)=T1Index*0.1;
[T2maxValue,T2Index]=max(C2(s,:));
indexT2(s)=T2Index*0.1;
end
end

% Muunnetaan huipun indeksiarvo pikosekunneiksi
indexT1ps=indexT1*Tstep;
indexT2ps=indexT2*Tstep;

% Lasketaan aika kaavan 11 osoittajaan
k11_osoittaja(:)=TV-indexT1ps-indexT2ps;
% Lasketaan kaavan 11 tulos eli ps/hit -suhdeluku
k11_tulos=k11_osoittaja./k11_nimittaja;

% Muutetaan DC-mittauksen hitit pikosekunneiksi, muodostetaan
% kumulatiivinen ajoitusdata
for s = 1:256
    DCps(s,:)=sum_measDC(1,s,:)*k11_tulos(s);
    DCpsCUM(s,T1pin)=offset+indexT1ps(s)+0.5*DCps(s,T1pin); %+indexT1ps(s)
    DCpsCUM(s,T1pin-1)=offset+indexT1ps(s)-0.5*DCps(s,T1pin);
    if T1pin == 3
        DCpsCUM(s,T1pin-2)=DCpsCUM(s,T1pin-1)-DCps(s,T1pin-1); % pin 3/2, on/off
    end
    for i=T1pin+1:8
        DCpsCUM(s,i)=DCpsCUM(s,T1pin)+sum(DCps(s,T1pin+1:i));
    end
end

% Lasketaan laserin tasoa kuvaava kokonaishittimäärä koko spektristä
T1SUM(:)=sum(sum(T1M(:,:,1:7),3),2);
T2SUM(:)=sum(sum(T2M(:,:,1:7),3),2);

for i=0:5
    T1crop(:,i+1)=T1PIN2(:,50*i+1);
    T2crop(:,i+1)=T2PIN5(:,50*i+1);
    C1crop(i+1,:)=C1(50*i+1,:);
    C2crop(i+1,:)=C2(50*i+1,:);
end
avg_bins=mean(DCps);
stddev_bins=std(DCps);

save
(filename,'C1','C2','TV','DCps','DCpsCUM','T1PIN2','T2PIN5','indexT1ps','in
dexT2ps','sum_measDC','DCR');

figure(1)
plot([1:256],DCpsCUM(:,1:7));
xlabel('spektripisteet');
ylabel('aika (ps)');
axis([0 256 -inf inf])
hold on

figure(2)
subplot(2,2,1), plot([1:size(T1PIN2,1)],T1crop,'LineWidth',1);

```

```

axis ([1 size(T1PIN2,1) -inf inf]);
xlabel('mittauksen vaihe');
ylabel('fotonimäärä 2. aikavälillä');
subplot(2,2,2), plot([1:size(T2PIN5,1)],T2crop,'LineWidth',1);
axis ([1 size(T2PIN5,1) -inf inf]);
xlabel('mittauksen vaihe');
ylabel('fotonimäärä 5. aikavälillä');
subplot(2,2,3), plot([1:size(C1,2)],C1crop,'LineWidth',1);
axis ([1 size(C1,2) -inf inf]);
set(gca,'YTick',[],'XTick',[])
subplot(2,2,4), plot([1:size(C2,2)],C2crop,'LineWidth',1);
axis ([1 size(C2,2) -inf inf]);
set(gca,'YTick',[],'XTick',[])

```

### Liite 3 Mittaustulosten K1-kompensointiin käytetty MATLAB-koodi

```

clear;
close all;
set(0,'defaultfigurecolor',[1 1 1])
skewfile = 'CAL50.mat'; % Tiedosto, josta ajoitusdata luetaan
folder = 'SE50'; % Kansiot, joista ramanmittausdata luetaan
first_subfolder = 0;
last_subfolder = 0;
folder_n = last_subfolder-first_subfolder+1;

finetune = 1; % säätökerroin kompensoinnin käsinsäätöön (ei käytetä)
firstpin = 1; % Raakaspektriin käytettävät pinnit ramansoftan
numeroinnilla (0-7)
lastpin = 5;
TG = 700; % K1-spektriin käytettävän aikaportin loppuhetki

% Aaltolukujen asetukset
waveLenLaser = 532; % Laserin aallonpituus nanometreinä
waveLenStart = 538.3; % Ensimmäisen spektripisteen aallonpituus
538.3 nm
waveLenPitch = 0.0352*5.8;% Vierekkäisten pikseleiden pitch aallonpituutena
(pitch(mm) * nm/mm 5.864)
waveNumberAxis = (1/waveLenLaser - 1./(waveLenStart + waveLenPitch.*[0:63
65:192 194:257])).*1e7;

timeAxis1 = ([0:3.3373:1001.19]);
timeAxis2 = ([0:0.33373:674.6]);

% Rasvoille baseline-korjaus seuraavilla pisteillä
BLP = ([20 40 60 88 115 143 174 205 228 248]);

% Luetaan ajoitusdata ja mittaustulokset
load (skewfile);
for k = first_subfolder:last_subfolder
fileID = fopen(['.\',folder,'\',num2str(k),'\A.txt']);
fileID;
for i = 1:256
for j = 1:8
A((k-first_subfolder+1),i,j) = textscan(fileID,'%u',1);
end
end
fclose(fileID);
end

% Lasketaan mittaukset yhteen ja valitaan raakaspektriin näytettävä
% aikaikkuna
RMATA=sum(double(cell2mat(A)),1);
RMAT=RMATA/sum(RMATA(1,1,:))
RMATRAW(:, :, :) = RMAT(:, :, firstpin+1:lastpin+1);
RMATSUM=sum(RMATRAW,3);
RDCR=RMATSUM-sum(DCR(1, :, firstpin+1:lastpin+1),3);

% Menetelmän K1-laskut
% Täydet pinnit
for s = 1:256
for i=1:8
if DCpsCUM(s,i) < TG

```

```

        MaxWholePin(s)=i;
        SharePin(s)=i+1;
    end
end
end
% Vajaan pinnin prosenttiosuus
for s=1:256
    ShareNom(s)=(TG-DCpsCUM(s,MaxWholePin(s)));
    ShareDenom(s)=DCpsCUM(s,SharePin(s))-DCpsCUM(s,MaxWholePin(s));
    Share(s)=ShareNom(s)/ShareDenom(s);
end

% Summa spektriä varten
for s=1:256

    K1SUM(s)=(sum(RMAT(1,s,2:MaxWholePin(s)))+finetune*Share(s)*RMAT(1,s,ShareP
in(s)))-(sum(DCR(1,s,2:MaxWholePin(s)))+Share(s)*DCR(1,s,SharePin(s)));
end

% Rasvojen baseline-korjaus
BLV = K1SUM(BLP); % Lasketaan baseline-arvot
blcoeff = polyfit(BLP,BLV,5) % Sovitetaan baseline-paraabeli
baseline = polyval(blcoeff,1:1:256);

SUMBLC = K1SUM-baseline;

figure(1)
plot([1:size(T1PIN2,1)],T1PIN2);
title('T1PIN2');
figure(2)
plot([1:size(T2PIN5,1)],T2PIN5);
title('T2PIN5');
figure(3);
plot(waveNumberAxis,DCpsCUM(:,1:7));
%plot([1:256],DCpsCUM(:,1:7));
%axis([0 257 -inf inf])
title('skew data');
hold on
%line([0 256], [TG TG],'LineWidth',0.25,'Color','k');
figure(4)
subplot(4,1,1), plot (waveNumberAxis, RDCR(1,:),
'LineWidth',1,'Color','k');
hold on
axis([800 inf -inf inf])
title('Raakaspektri');
%subplot(4,1,2), plot (smooth(RMATSUM, 'lowess'));
subplot(4,1,2), plot (waveNumberAxis, K1SUM, 'LineWidth',1,'Color','k');
axis([800 inf -inf inf])
title('Kompensatio (K1)');
subplot(4,1,3), plot (waveNumberAxis, SUMBLC, 'LineWidth',1,'Color','k');
axis([800 inf -2e-3 inf])
title('Kompensatio (K1) ja perustason korjaus');
subplot(4,1,4), plot (waveNumberAxis, smooth(SUMBLC, 3),
'LineWidth',1,'Color','k');
axis([800 inf -2e-3 inf])
title('Kompensatio (K1), perustason korjaus ja suodatus');

figure (5)
yyaxis left

```



```

subplot(2,1,1), plot (waveNumberAxis, RDCR(1,:),
'LineWidth',1.5,'Color','r','LineStyle','-');
%set(gca,'YTick', [])
ylabel('intensity (a.u.)')
grid on
hold on
subplot (2,1,1), plot (waveNumberAxis, K1SUM,
'LineWidth',1.5,'Color','b','LineStyle','-');
axis([800 inf 0.01 inf])
xlabel('Raman shift (1/cm)')
legend('Raman spectrum', 'K1-compensated spectrum','Location','southeast')

subplot(2,1,2),plot (waveNumberAxis, smooth(SUMBL, 3),
'LineWidth',1.5,'Color','k');
axis([800 inf -0.001 0.008])
grid on
ylabel('intensity (a.u.)')
xlabel('Raman shift (1/cm)')
legend('processed spectrum','Location','northwest')
%set(gca,'YTick', [])

```

#### Liite 4 Ajoitusdatan muodostamiseen menetelmällä M3 ja mittaustulosten kompensointiin menetelmällä M3 käytetty MATLAB-koodi

```

clear;
close all;

CalFolder = 'M3CAL70'; % Kansio, joista kalibrointimittausdata luetaan
CalFirst_subfolder = 0;
CalLast_subfolder = 0;
MeasFolder = 'K3SE70'; % Kansio, josta ramanmittausdata luetaan
MeasFirst_subfolder = 0;
MeasLast_subfolder = 0;
MeasFolder_n = MeasLast_subfolder-MeasFirst_subfolder+1;

firstpin = 1; % Keskiarvoon käytettävät pinnit ramansoftan numeroinnilla
(0-7)
lastpin = 5;
Sfirstpin = 1; % Spektreihin käytettävät täydet pinnit ramansoftan
numeroinnilla (0-7)
Slastpin = 3;
width = 71; % Nimellinen pinnin leveys (ps)
finetune = 1; % Kerroin korjauksen voimakkuuden käsinsäätöön, kompensoi
aikavälin poikkeamaa nimellisestä

waveLenLaser = 532; % Laserin aallonpituus nanometreinä
waveLenStart = 538.3; % Ensimmäisen spektripisteen aallonpituus
538.3 nm
waveLenPitch = 0.0352*5.8;% Vierekkäisten pikseleiden pitch aallonpituutena
(pitch(mm) * nm/mm 5.864)
waveNumberAxis = (1/waveLenLaser - 1./(waveLenStart + waveLenPitch.*[0:63
65:192 194:257])).*1e7;

% Rasvoille baseline-korjaus seuraavilla pisteillä
BLP = ([20 40 60 88 115 143 174 205 228 248]);

% Luetaan kalibrointimittausdata
for k = CalFirst_subfolder:CalLast_subfolder
fileID = fopen(['.\',CalFolder,'\ ',num2str(k),'\A.txt']);
fileID;
for i = 1:256
for j = 1:8
A((k-CalFirst_subfolder+1),i,j) = textscan(fileID,'%u',1);
end
end
fclose(fileID);
end

% Luetaan ramanmittausdata
for k = MeasFirst_subfolder:MeasLast_subfolder
fileID = fopen(['.\',MeasFolder,'\ ',num2str(k),'\A.txt']);
fileID;
for i = 1:256
for j = 1:8
B((k-MeasFirst_subfolder+1),i,j) = textscan(fileID,'%u',1);
end
end
fclose(fileID);
end

```

```

CMAT=sum(double(cell2mat(A)),1);

RMATA=sum(double(cell2mat(B)),1);
RMAT=RMATA/sum(RMATA(1,1,:));
RMATSP(:, :, :)=RMAT(:, :, Sfirstpin+1:Slastpin+1);
RMATSUM=sum(RMATSP,3);

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% Menetelmät M3 ja K3 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Ensin M3
% Lasketaan histogrammista keskiarvo olettaen osien leveydet yhtä suuriksi
for j = 1:256
for i = 1:8
    SumWeight(j,i) = i*CMAT(1,j,i);
end
KA(j)=sum(SumWeight(j,firstpin+1:lastpin+1))/sum(CMAT(1,j,firstpin+1:lastpin+1));
KAps(j)=KA(j)*width;
end
KApsZ=(KAps-min(KAps)); % Tässä korjauksen yleislinja nollassa
verrattuna
for s = 1:256
FULLK3(s) = sum(RMAT(1,s,Sfirstpin+1:Slastpin+1));
SHAREK3(s)=(KApsZ(s)/width)*RMAT(1,s,Slastpin+2);
TOTALK3(s)= FULLK3(s)+finetune*SHAREK3(s);
end

figure(1)
plot(KApsZ);

figure(2)
subplot(2,1,1),
plot(waveNumberAxis,KApsZ,'LineWidth',1.5,'Color','k','LineStyle','-');
axis([800 1800 -inf inf])
xlabel('ramansiirtymä (1/cm)')
ylabel('aika (ps)')
legend('ajoitusvirheen korjauksen muoto','Location','southwest')
grid on
subplot(2,1,2), plot
(waveNumberAxis,RMATSUM,'LineWidth',1.5,'Color','r','LineStyle','-');
axis([800 1800 0.007 0.026])
xlabel('ramansiirtymä (1/cm)')
ylabel('intensiteetti (a.u.)')
%set(gca,'YTick', [])
hold on
subplot(2,1,2), plot
(waveNumberAxis,TOTALK3,'LineWidth',1.5,'Color','b','LineStyle','-');
axis([800 1800 -inf inf])
legend('raakaspektri','K3-kompensoitu spektri','Location','northwest')
grid on

```